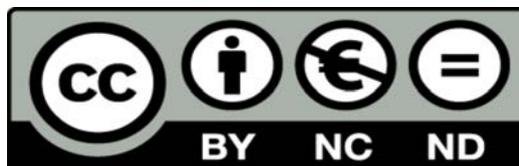




# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TESIS DOCTORAL

Título
<b>Identificación de biomarcadores pronósticos y predictivos en cáncer de recto localmente avanzado tratado con quimiorradioterapia neoadyuvante</b>
Autor/es
<b>Alfonso Martín Carnicero</b>
Director/es
Alfredo Martínez Ramírez y Ignacio Larráyoiz Roldán
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico



Identificación de biomarcadores pronósticos y predictivos en cáncer de recto localmente avanzado tratado con quimiorradioterapia neoadyuvante, tesis doctoral de Alfonso Martín Carnicero, dirigida por Alfredo Martínez Ramírez y Ignacio Larráyoiz Roldán (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

- © El autor
- © Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2023  
publicaciones.unirioja.es  
E-mail: publicaciones@unirioja.es



**UNIVERSIDAD  
DE LA RIOJA**



## **TESIS DOCTORAL 2022**

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y  
Biotecnológicas

# **IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS EN CÁNCER DE RECTO LOCALMENTE AVANZADO TRATADO CON QUIMIORRADIOTERAPIA NEOADYUVANTE**

**Alfonso Martín Carnicero**

**Directores:**

Alfredo Martínez Ramírez

Iñaki Larráyoiz Roldán

**Tutora:**

Carmen Torres Manrique





**UNIVERSIDAD  
DE LA RIOJA**



## **TESIS DOCTORAL 2022**

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y  
Biotecnológicas

# **IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS EN CÁNCER DE RECTO LOCALMENTE AVANZADO TRATADO CON QUIMIORRADIOTERAPIA NEOADYUVANTE**

**Alfonso Martín Carnicero**

**Director:** Alfredo Martínez Ramírez

**Director:** Iñaki Larráyoiz Roldán

**Tutora:** Carmen Torres Manrique





**UNIVERSIDAD  
DE LA RIOJA**



# **IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS EN CÁNCER DE RECTO LOCALMENTE AVANZADO TRATADO CON QUIMIORRADIOTERAPIA NEOADYUVANTE**

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y  
Biotecnológicas

Memoria presentada por D. Alfonso Martín Carnicero para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de La Rioja.

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Ramírez y el Dr. Ignacio Larrayoz Roldán, en el grupo de investigación de Angiogénesis del Centro de Investigaciones Biomédicas de La Rioja (CIBIR), y autorizamos a su presentación ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Logroño, 13 de diciembre de 2022.

MARTINEZ  
RAMIREZ  
ALFREDO - DNI  
16525626B

Firmado digitalmente  
por MARTINEZ  
RAMIREZ ALFREDO -  
DNI 16525626B  
Fecha: 2022.12.13  
12:42:55 +01'00'

Dr. Alfredo Martínez Ramírez.

LARRAYOZ  
ROLDAN  
IGNACIO - DNI  
33444445F

Firmado digitalmente  
por LARRAYOZ  
ROLDAN IGNACIO -  
DNI 33444445F  
Fecha: 2022.12.13  
12:57:16 +01'00'

Dr. Ignacio Larrayoz Roldán.



***Ex umbris et imaginibus in Veritatem***

*S. John Henry Newman*

*(1801 – 1890)*



*A Ester, Cristina y Jimena.  
Sin vosotras, nada hubiera sido posible.*



## GLOSARIO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

**5FU:** 5-Fluorouracilo. (5FUic = 5FU en infusión continua).

**AAP:** amputación abdomino-perineal.

**AJCC:** *American Joint Committee on Cancer.*

**APC:** *Adenomatous Polyposis Coli.* Gen que codifica a la proteína del mismo nombre.

**ASIRe:** tasa de incidencia estandarizada por edad ajustada a la población europea.

**ASIRw:** tasa de incidencia estandarizada por edad ajustada a la población mundial.

**ATEA:** arco tendinoso del músculo elevador del ano.

**AUC:** área bajo la curva.

**CAP:** colegio americano de patólogos.

**CCR:** cáncer colorrectal.

**cCR:** respuesta clínica completa.

**cCR:** respuesta clínica completa.

**cDNA:** DNA complementario.

**CIMP:** fenotipo metilador de las *CpG island*.

**CIN:** inestabilidad cromosómica.

**CMS:** *Colorectal Molecular Subtypes.* Subtipos moleculares del cáncer colorrectal

**CNX/CRT:** complejo Calnexina/Calreticulina.

**CR:** cáncer de recto.

**CRISPR:** *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.*

**CRISPR/Cas9:** sistema utilizado para cortar determinadas secuencias del DNA con el objetivo de inactivar el gen o introducir secuencias moldes a voluntad.

**CTC:** células tumorales circulantes.

**ctDNA:** DNA tumoral circulante.

**cTNM:** TNM clínico.

**DCXQT:** días desde la cirugía al inicio de la QT adyuvante.

**DDCX:** días desde el diagnóstico a la cirugía.

**DDQRT:** días desde el diagnóstico hasta el inicio de la QRT.

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermofisher Scientific*

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DQRTCX:** días desde el fin de la QRT a la cirugía.

**ECIS:** detección de impedancia de sustrato celular eléctrico.

**ECOG:** Eastern Cooperative Oncology Group. Escala de valoración funcional del paciente oncológico.

**EMVI:** invasión vascular extramural.

**EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

**ERAD:** *ER-associated degradation*. Sistema de degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico (ER).

**ERMan I:** enzima  $\alpha$ 1,2-manosidasa I

**ESMO:** *European Society Medical Oncology*. Sociedad europea de oncología médica.

**FAP:** ooliposis adenomatosa familiar.

**FDA:** *Food and Drug Association*.

**FDV:** fascia rectogenital o de Denonvillers.

**GRT:** grado de regresión tumoral.

**Hb:** hemoglobina.

**HNPCC:** cáncer colorrectal hereditario no polipósico.

**HP:** pólipos hiperplásicos.

**LARC:** cáncer de recto localmente avanzado.

**LCRT:** ciclo largo de radioterapia.

**LMR:** ratio linfocitos/monocitos.

**LncRNA:** *Long non-coding RNA*.

**LS:** síndrome de Lynch.

**LVI:** invasión linfovascular.

**MMR:** Mismatch Repair. Sistema de proteínas reparadoras

**MOCK:** transfección simulada. Es una transfección sin DNA para controlar el efecto potencial del reactivo de transfección en las células.

**MRC:** margen radial circunferencial.

**MRF:** fascia mesorrectal.

**mrTRG:** grado de regresión tumoral por RMN.

**MSI:** inestabilidad de microsatélites. MSI-L = Baja MSI (Low) MSI-H = Alta MSI (High)

**MSS:** estabilidad de microsatélites.

**MTT:** compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio utilizado en ensayos de viabilidad celular.

**N+:** afectación ganglionar.

**Nx:** número de ganglios linfáticos afectados tras la cirugía.

**Nt:** número de ganglios linfáticos extirpados tras la cirugía.

**NCI:** *National Cancer Institute*. Instituto americano del cáncer

**NGS:** *Next Generation Sequencing*. Secuenciación de última generación

**NLR:** ratio neutrófilo/linfocito.

**Nt:** número de ganglios resecaados.

**Nx:** número de ganglios metastásicos tras la cirugía.

**pCR:** respuesta completa patológica.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**PLR:** ratio plaquetas/linfocitos.

**PNI:** invasión perineural.

**PS:** *Performance Status*. Escala de estado funcional.

**pTNM:** TNM patológico.

**QRT:** quimiorradioterapia.

**qRT-PCR:** PCR cuantitativa

**QT:** quimioterapia.

**RMN:** resonancia magnética nuclear. (MRI en inglés)

**RNA:** ácido ribonucleico.

**ROC:** *Receiver Operating Characteristic*.

**RS:** supervivencia relativa estandarizada por edad.

**RT:** radioterapia.

**SCNA:** *Somatic Copy Number Alterations*.

**SCRT:** ciclo corto de radioterapia.

**SG:** supervivencia global.

**SLE:** supervivencia libre de enfermedad.

**SLP:** supervivencia libre de progresión.

**SLR:** supervivencia libre de recaída.

**SSL:** lesiones serradas sésiles.

**SSLD:** Lesiones serradas sésiles con displasia.

**TAC:** tomografía axial computarizada.

**TASAw:** tasa de mortalidad estandarizada por edad ajustada a la población mundial.

**TFP:** tasa de falsos positivos.

**TME:** extirpación total del mesorrecto.

**TNM:** sistema de estadificación de la extensión tumoral de la AJCC.

**TNT:** terapia neoadyuvante Total.

**TSA:** adenoma serrado tradicional.

**TVN:** tasa de verdaderos negativos.

**TVP:** tasa de verdaderos positivos.

**UICC:** *Union for International Cancer Control*. Unión internacional contra el cáncer.

**UPR:** *Unfold Protein Response*. Mecanismo de respuesta adaptativo de la célula ante estímulos estresantes.

**ypTNM:** TNM patológico post-neoadyuvancia

# **AGRADECIMIENTOS**

---



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Martínez, tutor de esta Tesis Doctoral, por ser el impulsor y motor principal de este trabajo. Por inculcarme el interés y la pasión por la investigación básica y traslacional. Por su confianza, sus consejos y su paciencia.

Al Dr. Iñaki Larrayoz, tutor de esta Tesis Doctoral, por su inestimable ayuda en las técnicas de análisis molecular y bioinformático, así como en la interpretación de los resultados y su colaboración siempre que lo he requerido.

Al Dr. Enrique Ramalle, por sus recomendaciones y supervisión de la parte estadística. Por su capacidad docente, disponibilidad y profesionalidad sin la que este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Susana Rubio, por su inmediata disposición siempre que la he requerido. Por su imprescindible ayuda en la revisión de todas las muestras histológicas de una manera altruista, desinteresada y siempre con una sonrisa.

Al Dr. Enrique Zozaya, patólogo de la Fundación Hospital de Calahorra, por su disponibilidad y ayuda siempre a mi disposición.

A las Dras. Martina Alonso, Miriam Zorrilla e Isabel Manrique, por su ayuda en la recogida de los consentimientos informados de los pacientes.

A todos los médicos, enfermeras, auxiliares y administrativos de los servicios de Oncología Médica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y del Hospital San Pedro de Logroño por enseñarme a ser oncólogo y por hacerme crecer personal y profesionalmente a lo largo de todos estos años.

Un apartado especial merece el Dr. José Manuel López Vega. Gracias por quitar la hojarasca del camino y por ser para mí una fuente de inspiración constante y un modelo de excelencia profesional al servicio de los pacientes.

A todos los médicos que han influido de manera especial en mi formación médica en Salamanca, especialmente al Dr. Manuel Rodríguez Rincón y al Dr. Juan Jesús Cruz, quien fue mi referente para hacer esta especialidad.

A mis amigos, que tanto me han empujado y apoyado en la consecución de este proyecto, sobre todo a José Ramón, por su confianza infinita, su apoyo incondicional y por compartir nuestra *Lead Kindly Light* y a David Méndez Soto, por ser mi amigo y mi hermano. Gracias por tantas vivencias juntos, por tus consejos, tu ayuda, y por el tiempo que ahora compartimos con nuestras familias.

A toda mi familia, en particular a mis tíos, con una especial dedicatoria *in memoriam* a mi tío José Ignacio. También a mi familia de El Burgo de Osma, de manera singular a Alejandro, Laura, Santi y Andrea.

A mi hermana, Fátima. Gracias por estar siempre ahí y siempre al servicio de todos. A mis padres, Ildefonso y María Jesús. Gracias por darme la vida, por la educación que nos habéis dado y por vuestros sacrificios y desvelos. Este éxito es vuestro.

A Ester, por compartir su vida conmigo. Por sus consejos, sacrificios y paciencia. Porque todos mis logros son los tuyos.

A mis hijas Cristina y Jimena, porque vosotras dais sentido a nuestra vida. Sois lo mejor que hemos hecho juntos. Os queremos muchísimo.

Finalmente, me gustaría agradecer a todos y cada uno de los pacientes que participaron en el estudio y a sus familias por su generosidad. Ellos son el principio y el fin de nuestra labor como médicos.

A todos.

Muchas gracias.

# ÍNDICE

---



<b>Indice .....</b>	<b>19</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>25</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>29</b>
1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal.....	31
1.1.1 Incidencia.....	31
1.1.2 Mortalidad .....	32
1.1.3 Prevalencia y supervivencia .....	33
1.1.4. Epidemiología del cáncer colorrectal en La Rioja .....	35
1.2. Embriología y anatomía quirúrgica del recto .....	36
1.2.1 Embriología del recto .....	36
1.2.2 Anatomía quirúrgica del recto.....	37
1.3. Biología Molecular del cáncer colorrectal .....	53
1.3.1 Modelo canónico de la carcinogénesis en CCR .....	53
1.3.2 Oncogenes y genes supresores más relevantes en CCR .....	55
1.3.3 Vías moleculares de la carcinogénesis del CCR .....	59
1.3.4 Subtipos moleculares del CCR.....	72
1.4. Factores de riesgo y factores preventivos .....	75
1.4.1 Factores de riesgo .....	76
1.4.2 Factores preventivos .....	87
1.5. Presentación clínica del cáncer de recto .....	90
1.6. Diagnóstico y estadificación del cáncer de recto .....	90
1.6.1. Diagnóstico precoz.....	90
1.6.2 Pruebas complementarias.....	91
1.6.2.1. Marcadores tumorales .....	91
1.6.2.2. Endoscopia.....	91
1.6.2.3. Biopsia.....	91
1.6.2.4. Exploraciones radiológicas .....	93
1.6.3. Estadificación .....	96
1.6.3.1. Estadificación pre-quirúrgica (cTNM).....	96
1.6.3.2. Estadificación post-quirúrgica (ypTNM) .....	98
1.7. Tratamiento del cáncer de recto.....	100
1.7.1 Tratamiento quirúrgico. Recuerdo histórico y tratamiento actual .....	100
1.7.1.1 Estomas .....	100
1.7.1.2 Abordaje perineal.....	100

1.7.1.3 Abordaje posterior .....	101
1.7.1.4 Cirugía abdómino-perineal.....	101
1.7.1.5 Preservación de esfínteres .....	103
1.7.1.7 Extirpación total del mesorrecto (TME) .....	104
1.7.1.7 Nuevas técnicas quirúrgicas .....	105
1.7.1.8 Estrategia “ <i>Watch and wait</i> ” .....	107
1.7.2. Tratamiento locorregional y sistémico: radio y quimioterapia.....	107
1.7.2.1 Tratamiento adyuvante .....	107
1.7.2.2 Tratamiento neoadyuvante .....	108
1.8 Biomarcadores en cáncer de recto localmente avanzado (LARC).....	117
1.8.1 Definición de biomarcador.....	117
1.8.2 Diferencia entre biomarcador pronóstico y predictivo. ....	118
1.8.3 Biomarcadores pre-QRT neoadyuvante .....	118
1.8.3.1 Biomarcadores clínicos.....	118
1.8.3.2 Biomarcadores de imagen .....	119
1.8.3.3 Biomarcadores analíticos.....	122
1.8.3.4 Biomarcadores anatomo-patológicos.....	123
1.8.3.5 Perfiles genómicos y transcriptómicos .....	124
1.8.4 Biomarcadores post-QRT neoadyuvante.....	129
1.8.4.1. Biomarcadores clínicos.....	129
1.8.4.2. Biomarcadores analíticos.....	130
1.8.4.3. Biomarcadores de imagen .....	131
1.8.5 Biomarcadores post-QRT neoadyuvante y cirugía .....	133
1.8.5.1. Biomarcadores anatomo-patológicos.....	133
<b>2. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>141</b>
<b>3. Material y métodos .....</b>	<b>145</b>
3.1 Ámbito del estudio .....	147
3.2 Tipo de estudio .....	147
3.3 Diseño del estudio .....	147
3.4 Selección de la muestra.....	148
3.4.1. Criterios de inclusión .....	148
3.4.2 Criterios de exclusión .....	148
3.5 Recogida y análisis de datos .....	149
3.5.1 Definición de variables .....	149

3.5.2. Recogida y selección de material clínico .....	152
3.5.3. Primera fase o fase de exploración .....	152
3.5.3.1. Extracción de RNA y transcripción inversa .....	153
3.5.3.2. Ultrasecuenciación, análisis de datos y vías implicadas .....	153
3.5.3.3. Análisis bioinformático .....	153
3.5.3.4. Comprobación de resultados mediante RT-PCR .....	154
3.5.4. Segunda fase o fase de confirmación .....	155
3.5.4.1. Cultivo celular .....	155
3.5.4.2. Construcción de vectores. ....	156
3.5.4.3. Transformación de <i>E. Coli</i> y selección colonias con plásmidos	159
3.5.4.4. Extracción de DNA plasmídico.....	161
3.5.4.5 Transfección celular.....	161
3.5.4.6 Extracción de RNAs.....	161
3.5.4.7 qRT-PCR.....	161
3.5.4.8. Proliferación celular .....	162
3.5.5. Tercera fase o fase de validación.....	163
3.5.6. Cuarta fase o fase de análisis .....	164
3.6 Aspectos éticos y legales.....	164
<b>4. Resultados .....</b>	<b>165</b>
4.1 Estadística descriptiva .....	167
4.1.1 Datos epidemiológicos .....	167
4.1.2 Características tumorales.....	168
4.1.3 Determinaciones analíticas al diagnóstico.....	171
4.1.4 Variables relacionadas con el tratamiento neoadyuvante .....	178
4.1.5. Determinaciones analíticas tras la QRT .....	179
4.1.6. Variables relacionadas con la cirugía .....	182
4.1.7. Determinaciones analíticas tras la cirugía .....	186
4.1.8. Variables relacionadas con el tratamiento adyuvante.....	190
4.1.9. Determinaciones analíticas tras la QT adyuvante/seguimiento.....	191
4.1.10. Seguimiento .....	194
4.1.11. Recaída, supervivencia y mortalidad .....	195
4.1.12. Diferencias entre la cohorte de exploración y la de validación.....	197
4.2 Resultados por fases .....	198
4.2.1. Fase de exploración .....	198
4.2.2. Fase de confirmación .....	201

4.2.2.1. Análisis de la proliferación celular .....	201
4.2.2.2. Análisis del gen EDEM3 .....	203
4.2.2.3. Análisis del gen LINC01433.....	207
4.2.3. Fase de validación .....	211
4.2.4. Fase de análisis .....	211
4.2.4.1. Análisis de factores pronósticos.....	211
4.2.4.1.1. Cinética de los parámetros hematológicos .....	217
4.2.4.1.2. Índice de Youden para las variables pronósticas.....	222
4.2.4.1.3. Análisis multivariable de supervivencia .....	232
4.2.4.1.4. Factores pronósticos de supervivencia.....	233
4.2.4.1.5. Regresión logística y modelo pronóstico .....	246
4.2.4.2. Análisis de factores predictivos.....	248
4.2.4.2.1. Cinética de los parámetros hematológicos .....	252
4.2.4.2.2. Índice de Youden para las variables predictivas .....	256
4.2.4.2.3. Regresión logística y modelo predictivo .....	260
<b>5. Discusión .....</b>	<b>263</b>
5.1 Discusión de la estadística descriptiva, diseño y metodología .....	265
5.2. Discusión de las fases de exploración y validación .....	267
5.2.1. EDEM3.....	267
5.2.2. LINC01433.....	270
5.2.3. Fase de validación .....	272
5.2.4. Consideraciones respecto a EDEM3 y LINC01433 .....	272
5.3. Discusión de la fase de análisis .....	274
5.3.1. Biomarcadores pronósticos .....	274
5.3.2. Consideraciones respecto al modelo pronóstico .....	278
5.3.3. Biomarcadores predictivos .....	279
5.3.4. Consideraciones respecto al modelo predictivo.....	279
5.4. Corolario .....	280
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>281</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>285</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>349</b>

## RESUMEN

---



## **Resumen**

### Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores más frecuentes de nuestro entorno con una incidencia creciente y una mortalidad elevada. Se estima que aproximadamente un tercio de todos los CCR se localizan en el recto. Entre las estrategias de tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado (LARC) se encuentra la quimiorradioterapia (QRT) neoadyuvante seguida de cirugía basada en la extirpación total del mesorrecto. Esta estrategia ha demostrado mejorar los resultados en comparación con la QRT adyuvante, aunque no se han observado diferencias en supervivencia global.

### Material y métodos

Esta tesis presenta un estudio observacional retrospectivo de casos y controles en 77 pacientes diagnosticados de LARC entre 2007 y 2017 en el Hospital San Pedro de Logroño y la Fundación Hospital de Calahorra que fueron tratados con QRT neoadyuvante y cirugía. El estudio engloba cuatro fases.

- En la primera se realiza ultrasecuenciación masiva de las biopsias diagnósticas de una cohorte de 41 pacientes en busca de genes con expresión diferencial que permita predecir la recaída.
- En la segunda se estudia el mecanismo de acción de los genes encontrados en líneas celulares mediante su silenciamiento y sobreexpresión, para determinar su papel en proliferación o migración.
- En la tercera fase se aplica el modelo encontrado en la primera fase a una nueva cohorte de 36 pacientes para intentar validar esta firma genómica.
- En la cuarta fase se realiza un análisis estadístico de todas las variables clínicas, analíticas y patológicas de la cohorte completa.

### Resultados

En la primera fase hemos identificado un perfil de cinco genes con expresión diferencial con una excelente capacidad pronóstica (AUC = 0,937). De estos cinco genes, solo dos de ellos están identificados: EDEM3 y LINC01433. En la segunda fase, hemos demostrado que el silenciamiento de EDEM3 reduce la capacidad proliferativa y migratoria de las células HCT116 y que la

sobreexpresión de LINC01433 aumenta los niveles de proliferación y migración de estas células, por lo que ambos genes podrían ejercer un papel promotor de la oncogénesis. En la tercera fase, no hemos demostrado la sobreexpresión de cuatro de los cinco genes del modelo pronóstico. Solo EDEM3 siguió estando sobreexpresado, aunque su capacidad pronóstica en solitario no fue relevante. En la cuarta fase encontramos que las mutaciones en KRAS se asocian a una menor supervivencia libre de recaída y supervivencia global a 5 años ( $p = 0,005$  y  $0,022$ ; respectivamente). También confirmamos el valor pronóstico adverso de otras variables como la invasión vascular extramural (EMVI), la invasión linfovascular (LVI), el grado histológico pobremente diferenciado (G3),  $Hb2 < 12,3g/dL$ ;  $Hb3 < 11,45g/dL$ ;  $LMR2 < 1,26$  y  $PLR2 > 229,5$  y afectación ganglionar tras la cirugía (ypN+). También demostramos la ausencia de correlación entre el grado de regresión tumoral y la supervivencia.

Por último, hemos realizado un modelo pronóstico basado en cuatro variables: hemoglobina (Hb2), ratio linfocito/monocito (LMR2) y ratio plaquetas/linfocitos (PLR2) tras la QRT neoadyuvante y el número de ganglios metastásicos tras la cirugía (Nx) con una capacidad pronóstica de recaída excelente (AUC = 0,84; IC 95%: 0,74 – 0,94;  $p < 0,001$ ). Junto al modelo pronóstico, hemos analizado el papel de la bilirrubina como factor predictivo de respuesta con una capacidad discriminativa aceptable (AUC = 0,75; 95% CI 0.62 – 0,88;  $p = 0,001$ ).

### Conclusiones

Describimos un modelo pronóstico de cinco genes con una elevada capacidad pronóstica, pero no hemos podido validarlo. La sobreexpresión de EDEM3 se mantiene en la población de mal pronóstico, por lo que el papel de este gen merece seguir investigándose. Las mutaciones de KRAS en los pacientes con LARC se asocian a un mal pronóstico. Proponemos un modelo de pronóstico de recaída en pacientes de acuerdo al número de ganglios linfáticos positivos tras la cirugía, los niveles de hemoglobina y las ratios LMR y PLR obtenidos tras la QRT neoadyuvante. Por último, la bilirrubina podría tener un modesto papel predictivo de respuesta a la QRT neoadyuvante

# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1. Introducción

### 1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal

El cáncer de recto (CR) representa aproximadamente el 30% de todos los casos de cáncer colorrectal (CCR). Más de dos tercios de los pacientes con CR son mayores de 60 años, siendo una entidad muy infrecuente en menores de 45 años. La mayoría de datos epidemiológicos del CR suelen englobarse con el CCR (1).

#### 1.1.1 Incidencia

A nivel mundial, las estimaciones de 2020 (2) sitúan al cáncer colorrectal (CCR) como el tercero en incidencia en el varón tras el cáncer de pulmón y el de próstata (1.065.960; 10,6% del total), y el segundo en la mujer tras el cáncer de mama (865.630 casos, 9,4% del total). La tasa de incidencia estandarizada por edad ajustada a la población mundial (ASIRw) es de 19,5 casos por 100.000 habitantes (3). El CR supone el 37,9% de todos los casos de CCR, con 732.210 casos, ocupando el 6º lugar en hombres (443.358 casos; 4,4% del total) y el 9º en mujeres (288.853 casos; 3,13% del total) (4).

En Europa, el CR supone el 35% de todos los casos de CCR, siendo el quinto en incidencia en varones (108.489 casos) y el sexto en mujeres (73.220 casos), con una ASIRw para ambos sexos, de 30,4 casos por 100.000 habitantes (2) (Tabla 1).

Incidencia	Global		Hombres		Mujeres	
	Total	ASIRw	Total	ASIRw	Total	ASIRw
Mundial CCR	1.931.590	19,5	1.065.960	23,4	865.630	16,2
Europea CCR	519.820	30,4	281.714	37,9	238.106	24,6
España CCR*	43.581	38,7	25.678	48,6	17.903	28,8
Mundial CR	732.210	7,6	443.358	9,8	288.852	5,6
Europea CR	181.709	11,2	108.489	15,1	73.220	8,0
España CR*	14.209	13,5	8.720	17,4	4.750	8,4

\* Datos de 2022.

En España, las proyecciones de incidencia para el año 2022 (5), sin contar el impacto de la pandemia COVID, muestran al CCR como el tumor con mayor incidencia para ambos sexos (43.370 casos) seguido del cáncer de mama (34.750), pulmón (30.948) y próstata (30.884). La ASIRw del CCR en nuestro país es superior a la tasa europea y mundial (35,8 vs 30,4 y 19,5 respectivamente) fundamentalmente en hombres (2). Con los datos desglosados, la incidencia estimada del cáncer de recto alcanza los 14.664

casos (el 33% de los CCR) con una ASIRw de 18,3 en varones y 9,5 en mujeres por 100.00 habitantes.

En algunos países desarrollados como Estados Unidos, la incidencia de CCR en ambos sexos está disminuyendo en mayores de 50 años. Sin embargo, esta disminución de la incidencia global está enmascarando las crecientes tasas en adultos menores de 50 años; un incremento de etiología desconocida pero que podría estar en relación con los cambios en la dieta, la inactividad física y la epidemia de obesidad que asola el país (6).

España ocupa una posición intermedia a nivel europeo, pero con una incidencia creciente de CCR y CR desde mediados de los años 90. Este incremento se ha reflejado en ambos sexos, aunque especialmente en varones. Dado que los programas de cribado en nuestro país están mayoritariamente extendidos, se cree que el incremento se debe fundamentalmente a los cambios en la dieta y a los factores de riesgo del estilo de vida occidental (7)(Tabla 2).

<b>Tabla 2. Incidencia por periodos temporales. adaptada de Galceran J et al (7)</b>				
<b>ASIRe CCR</b>	<b>CCR</b>			
	Hombres	% incremento	Mujeres	% incremento
1993-1997	31,3		22,6	
1998-2002	37,7	20,6%	23,9	5,7%
2003-2007	42,1	35%	25,1	11%
2015 (proyección)	49	58%	29,7	31%
<b>ASIRe CR</b>	<b>CR</b>			
1993-1997	20,4		10,7	
1998-2002	22,8	11,7%	11,1	3,7%
2003-2007	24,1	18,1%	11,1	3,7%
2015 (proyección)	28,8	41%	12,4	15,8%

*ASIRe: tasa de mortalidad estandarizada a la población europea*

### **1.1.2 Mortalidad**

Aunque el CCR es más prevalente en los países desarrollados (casi el 55% de todos los casos), las estimaciones para 2020 a nivel mundial lo colocan en el segundo lugar en mortalidad para ambos sexos tras el cáncer de pulmón (935.173 muertes, 9,4% del total). La tasa de mortalidad estandarizada a la población mundial (TASAw) es de 9 por 100.000 habitantes (2).

En Europa las estimaciones son similares (2)(8), siendo el CCR la segunda causa de muerte en varones tras el cáncer de pulmón, y el tercero en mujeres tras el cáncer de pulmón y el de mama con una TASA<sub>w</sub> de 12,3 por 100.000 habitantes (244.824 casos). A pesar de las diferencias entre sexos y entre las distintas regiones de Europa, en la mayoría de países se objetiva una reducción progresiva de la mortalidad en los últimos 40 años (10), y un incremento sostenido de la supervivencia por CCR.

Para España, el CCR ocupa el segundo lugar en mortalidad para ambos sexos tras el cáncer de pulmón (22.930) y por delante del cáncer de páncreas (7.568) con una TASA<sub>w</sub> de 11,5 por 100.000 habitantes. La tasa de mortalidad del CR alcanzaba los 4.321 casos, con una TASA<sub>w</sub> de 4,6 casos en varones y 2,0 casos en mujeres por 100.000 habitantes (2). Es destacable que a pesar de la mayor incidencia en nuestro país en comparación con Europa y a nivel mundial, las tasas de mortalidad estimadas tanto para el CCR como para el CR son inferiores.

### **1.1.3 Prevalencia y supervivencia**

Actualmente, los datos publicados sobre supervivencia se basan en los registros de población internacionales del SEER (11) (Estados Unidos), EUROCORE (12), del *European Cancer Information System* (13) (Europa) y CONCORD (14).

Los datos del registro EUROCORE-5 (15) nos proporcionan una supervivencia relativa estandarizada por edad (RS) a 5 años del 57% para el CCR y del 56% para el CR, siendo mayor en países de Europa del norte y central sobre Europa del sur y del este y mejor en mujeres que en hombres. Por rangos de edad, la RS disminuye progresivamente a medida que aumenta la edad (Figura 1).

Las diferencias de supervivencia por regiones fueron más marcadas en CR, donde la supervivencia fue menor en los países de Europa del este, alcanzando diferencias de entre 15-20 puntos porcentuales frente a los países de Europa central y Europa del norte (16). La RS del CCR ha aumentado globalmente y de manera estadísticamente significativa en todos los países europeos desde el periodo 1999-2001 al 2005-2007(16) (Tabla 3). Este incremento en la supervivencia por CR se ha objetivado de manera más notable en España, con un aumento absoluto de la supervivencia neta estandarizada por edad del 10% (del 73% al 83%) a 1 año y del 18% (del 42% al 60%) a 5 años comparando las series históricas entre 1992 y 2004 (17) (Figura 2).

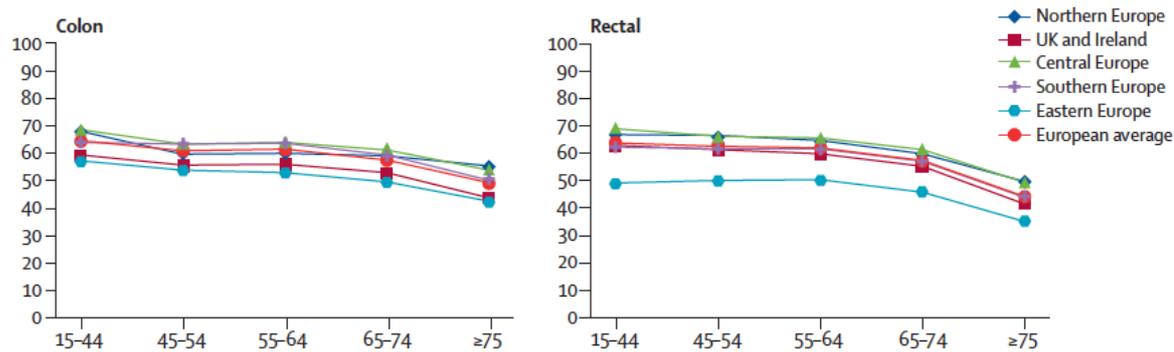


Figura 1. RS específica a 5 años en el periodo 2000-2007. Tomado de (16)

**Tabla 3. Comparación de RS específica a 5 años. Tomado de (16)**

Media Europea				Diferencias entre 2005-2007 y 1999-2001	
Localización	Periodo temporal	RS (%)	ES*	Absoluta (%)	p-valor
Colon	1999-2001	54,2	0,2	3,8	<0,001
	2005-2007	58,1	0,2		
Recto	1999-2001	52,1	0,3	5,5	<0,001
	2005-2007	57,6	0,2		

\*ES: error estándar

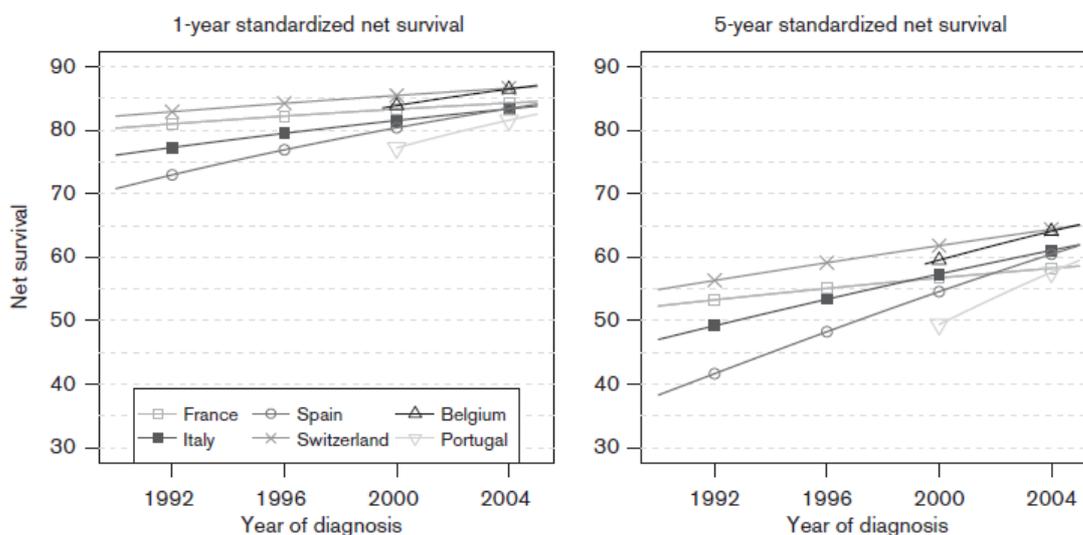


Figura 2. Comparación de RS específica a 5 años. Tomado de (17)

El incremento en supervivencia y el descenso paralelo de la mortalidad de los pacientes con CCR, y más particularmente en el CR, son reflejo de: a) las progresivas mejoras en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, incluyendo una mayor sensibilidad de las pruebas diagnósticas (ecoendoscopia y RMN) y de las técnicas quirúrgicas (resección total del mesorrecto); b) de una mayor subespecialización de los cirujanos; c) de la estandarización de la radioterapia preoperatoria y d) de la introducción de nuevos esquemas de quimioterapia.

Conviene recordar el papel del diagnóstico precoz y los programas de *screening* en el aumento de supervivencia, aunque no debemos olvidar que la inclusión en los registros de tumores en estadios precoces podría producir un sesgo de sobrediagnóstico, aunque se cree que el efecto de este sesgo en CCR es pequeño (17).

#### 1.1.4 **Epidemiología del cáncer colorrectal en La Rioja**

En La Rioja disponemos de datos de incidencia correspondientes al año 2015 (18) (Tabla 4). Aunque no se pueden realizar comparaciones de datos correspondientes a años diferentes, sí podemos afirmar que las tasas de incidencia de CCR y CR en La Rioja en varones están en consonancia con los datos recogidos a nivel nacional, destacando una menor incidencia en mujeres (-9,8% y -32% respectivamente).

<b>Tabla 4. Tasas de incidencia por CCR y CR. Elaboración propia basada en (2,18)</b>							
<b>Incidencia</b>		<b>Global</b>		<b>Hombres</b>		<b>Mujeres</b>	
		Total	ASIRw	Total	ASIRw	Total	ASIRw
C C R	Mundial	1.931.590	19,5	1.065.960	23,4	865.630	16,2
	Europea	519.820	30,4	281.714	37,9	238.106	24,6
	España	43.581	38,7	25.678	48,6	17.903	28,8
	La Rioja*	271	-	172	49,8	99	25,2
C R	Mundial	732.210	7,6	443.358	9,8	288.852	5,6
	Europea	181.709	11,2	108.489	15,1	73.220	8,0
	España	14.209	13,5	8.720	17,4	4.750	8,4
	La Rioja*	81	-	60	18,8	21	5,6

\* Datos de 2015.

Respecto a la mortalidad (19), los datos oficiales del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) correspondientes al año 2019 nos permiten constatar como la tasa de mortalidad por

CCR en varones es superior a la tasa nacional (+6,4%), mientras que en mujeres es menor (-8,6%). Respecto al CR, la tasa de mortalidad en mujeres es menor a la tasa nacional (-25,5%), mientras que en hombres es más del doble (+6,3%) (Tabla 5).

**Tabla 5. Tasas de mortalidad por CCR y CR. Elaboración propia basada en (2,18)**

Mortalidad		Global		Hombres		Mujeres	
		Total	ASIRw	Total	ASIRw	Total	ASIRw
C C R	Mundial	935.173	9	515.637	11	419.536	7,2
	Europea	244.824	12,3	131.885	16,1	112.939	9,5
	España	16.470	11,5	9.640	15,5	6.830	8,2
	La Rioja*	124	-	76	16,4	45	7,4
C R	Mundial	339.022	3,3	204.104	4,4	134.918	2,4
	Europea	82.073	4,4	47.923	6,1	34.150	3,1
	España	4.321	3,2	2.724	4,6	1.597	2
	La Rioja*	33	-	24	4,8	9	1,4

\* Datos de 2019.

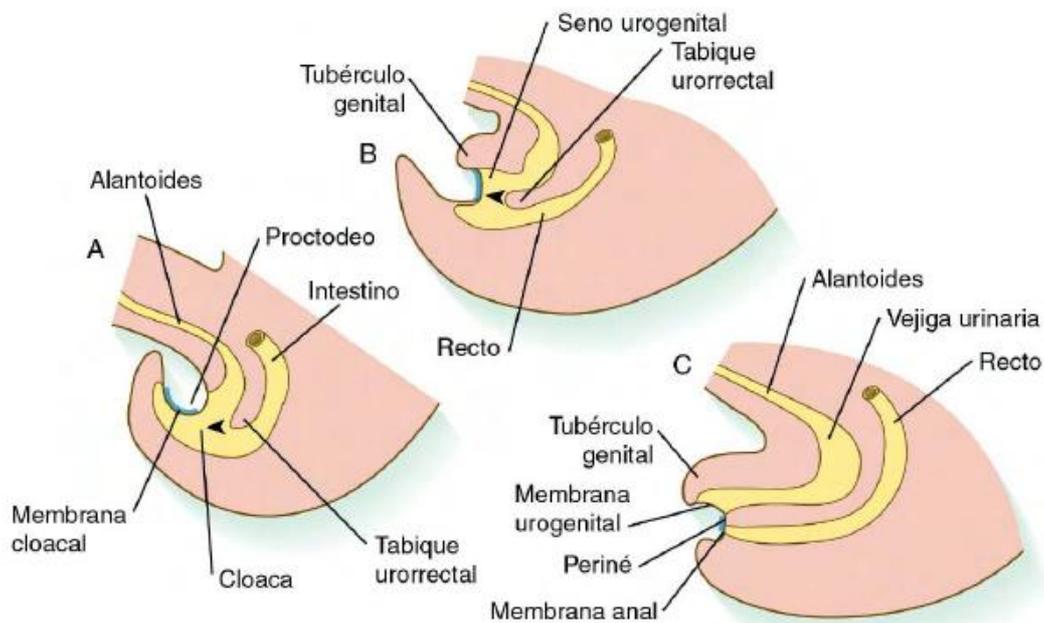
## **1.2 Embriología y anatomía quirúrgica del recto.**

### **1.2.1 Embriología del recto**

Al inicio de la tercera semana del desarrollo embrionario, como consecuencia de la aparición de los pliegues cefálico, caudal y lateral, se inicia la formación del intestino primitivo derivado del endodermo. Inicialmente se delimitan las estructuras tubulares del intestino anterior y posterior y finalmente el intestino medio, que permanecerá abierto al saco vitelino durante cierto tiempo (20,21).

En el intestino posterior se desarrolla de manera paralela una evaginación tubular que se denomina alantoides y que será el germen del futuro seno urogenital común. Caudal al alantoides se encuentra la cloaca o membrana proctodeal, formada por una bicapa ectodermo-endodermo que en el embrión supone un tracto de salida común entre los sistemas digestivo y genitourinario. A lo largo de la cuarta y quinta semana, se va desarrollando un tabique de tejido mesodérmico entre el intestino posterior y la base del alantoides. Este tabique uorrectal seguirá desarrollándose durante la sexta y séptima semanas avanzando hasta la cloaca hasta conseguir dividirla en un segmento ventral (seno urogenital) y otro dorsal (conducto anorrectal) (20,21) (Figura 3).

Como consecuencia de esta división, la membrana cloacal también se divide en una membrana anal y otra urogenital que posteriormente desaparecerán. El tabique urorrectal, mesodérmico, junto con parte de esa membrana cloacal dará lugar al periné. Del canal anorrectal surgirán el recto y la mitad superior del canal anal. La cubierta de la mitad inferior del canal anal se forma a partir del ectodermo que rodea al proctodeo. El resto derivará del endodermo del intestino posterior. La vascularización del conducto anal refleja su doble origen. Así, la parte craneal está irrigada por la arteria rectal superior, rama de la arteria mesentérica inferior, mientras que la caudal lo está por la arteria rectal inferior, rama de la arteria pudenda interna (Ver apartado 2.6).



**Figura 3. Etapas en la subdivisión de la cloaca común por el tabique urorrectal.**

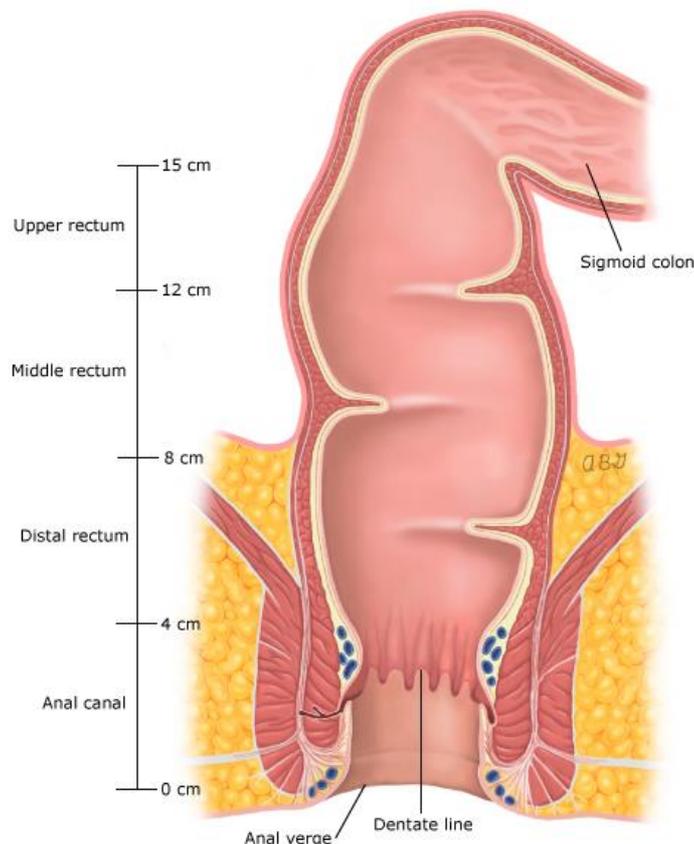
**A) En la quinta semana. B) En la sexta semana. C) En la octava semana. Tomado de(21)**

### **1.2.2 Anatomía quirúrgica del recto**

La palabra “recto” deriva del término latino “*intestinum rectum*” que aparece por primera vez en los escritos de Celso (siglo I d.C.) como traducción latina de la palabra griega “*τὸ ἀπευθυσμένον*” (*tò apeuthysménon*) y que literalmente significa “el enderezado”. Este término griego es utilizado desde Diocles en el siglo IV a.C. y tras traducirse al latín medieval se documenta posteriormente en español en 1498 como “*recto yntestino*” (22). Algunos autores afirman que su nombre deriva de la dirección rectilínea que presenta en los animales en los que se realizaron los primeros estudios anatómicos en la era galénica, ya que en la especie humana presenta varias curvas (probablemente debidas a la bipedestación): tres de ellas en el plano frontal (válvulas de Houston, dos izquierdas y una derecha) y una en el sagital (23).

En adultos, podemos afirmar que no existe una definición anatómica uniformemente aceptada para el recto. Se considera que mide unos 13 cm de largo y que comienza anterior a la vértebra S3 como una continuación del colon sigmoide. Desde allí, desciende siguiendo la curvatura sacra y el coxis y termina anterior a la punta del coxis en el diafragma pélvico y continuándose con el canal anal (24).

Con respecto al límite distal, los cirujanos lo sitúan en el anillo anorrectal muscular mientras que los anatomistas lo identifican con la línea pectínea o dentada (25). Se admite por tanto que el recto puede dividirse en tres partes: tercio inferior, situado a 0-5 cm del margen anal, tercio medio de 5 a 10 cm y tercio superior de 10-15 cm (26). La cara anterior y las caras laterales del recto superior están recubiertas por peritoneo visceral, mientras que la cara posterior del tercio superior y los tercios medio e inferior son completamente extraperitoneales (27). Hay que tener en cuenta que las distancias referidas son orientativas debido a la variabilidad individual. De hecho, la reflexión peritoneal situada en la pared rectal anterior, suele encontrarse a una distancia estimada desde el margen anal de 7 a 9 cm en hombres, y de 5 a 7,5 cm en mujeres (28) (Figura 4).

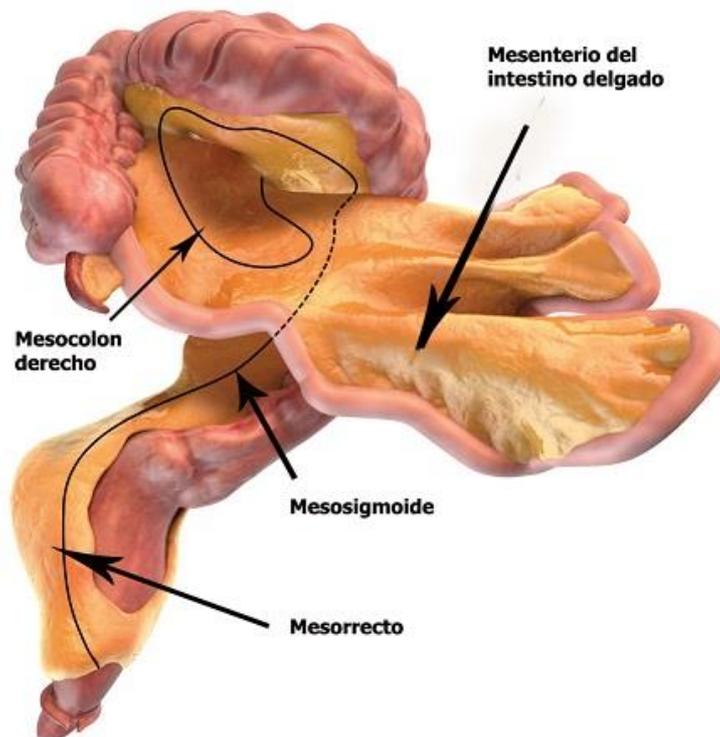


**Figura 4. Divisiones anatómicas del recto. Tomado de (29)**

### 1.2.2.1 Mesorrecto. Fascia perirrectal, propia o mesorrectal

En embriología, el término mesorrecto se utiliza para describir el tejido mesenquimal situado entre el recto y la concavidad del sacro. Mientras que en otras partes del tracto gastrointestinal este tejido dará lugar a los mesenterios, en el recto sólo produce un tejido fibroso que dará lugar a la fascia perirrectal (30).

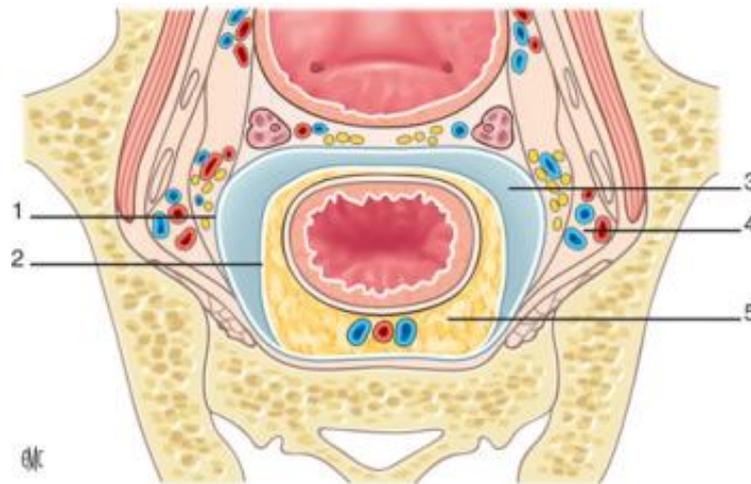
El mesorrecto es una noción de anatomía quirúrgica impropia desde un punto de vista de la nomenclatura anatómica por eso el término mesorrecto no aparece en la *Nomina Anatomica* y está restringido a la *Nomina Embryologica* (30). De hecho, algunos autores consideran que etimológicamente es un término inapropiado, ya que el prefijo "meso", en términos anatómicos, se emplea para definir el revestimiento de un órgano por dos capas de peritoneo que permiten su suspensión (Figura 5) (31) (32).



**Figura 5. Intestino delgado y grueso con su mesenterio. Tomado de (33)**

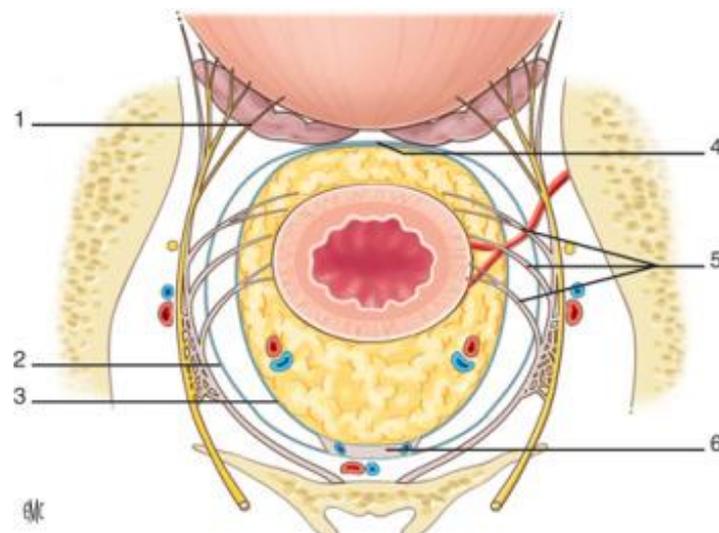
El término mesorrecto tal y como lo concebimos hoy en día se atribuye a Maunsell quien lo utilizó por primera vez en 1892 (34) y a Heald (30,35), quien difundió la importancia de su extirpación completa en la cirugía del cáncer de recto, y desarrolló la técnica denominada extirpación total del mesorrecto (TME), en la que éste constituye el lado visceral del "plano sagrado" de resección (36).

Para estos autores, el mesorrecto está comprendido por el manguito de grasa (grasa perirrectal) incluido dentro de la fascia perirrectal que rodea al recto y contiene los ganglios linfáticos y los vasos sanguíneos rectales (Figuras 6 y 7). Este mesorrecto es más grueso en la cara posterior y lateral del recto debido a la mayor abundancia de tejido graso en dicha zona que en la cara anterior, y se admite que finaliza aproximadamente a 2 cm por encima del músculo puborrectal (37).



**Figura 6. Corte horizontal de la parte alta del recto.**

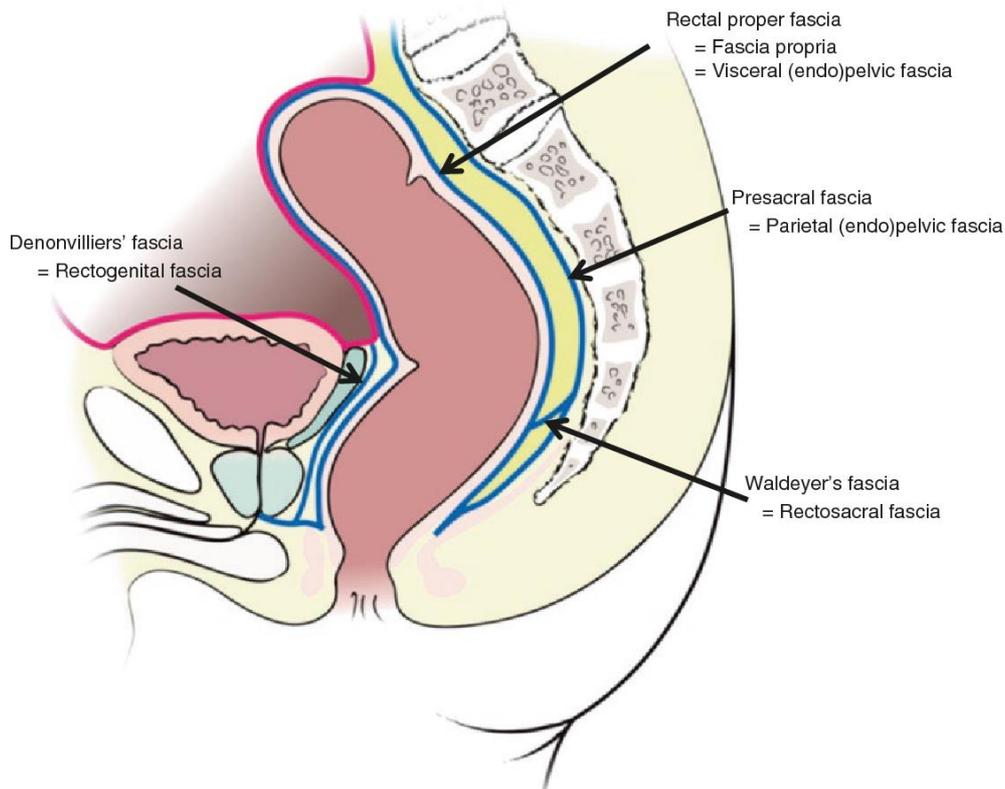
**1. Lámina visceral (o fascia rectal) de la fascia pélvica; 2. lámina parietal de la fascia pélvica; 3. espacio vasculonervioso por fuera de la lámina parietal; 4. mesorrecto; 5. cavidad peritoneal (fondo de saco de Douglas). Tomado de (31)**



**Figura 7. Corte axial del recto por debajo del fondo de saco de Douglas en el varón.**

**Leyenda figura inferior: 1. Aponeurosis prostatoperitoneal de Denonvilliers; 2. lámina parietal de la fascia pélvica; 3. Lámina visceral (o fascia rectal) de la fascia pélvica; 4. fascia presacra (de Waldeyer) fusionada con la lámina visceral para formar el ligamento sacrorrectal; 5. nervio erector (de Eckart); 6. «alerones» o ligamentos laterales del recto. Tomado de (31).**

La fascia perirrectal, también llamada propia o mesorrectal (38) es una proyección anterior de la fascia endopélvica parietal que recubre las paredes y el piso de la pelvis (Figura 8). La fascia perirrectal, fue descrita por el cirujano y anatomista rumano Thomas Jonnesco que la denominó “*la gaine fibreuse du rectum*” pero sus hallazgos no fueron publicados hasta 1896 gracias a la colaboración de Adrien Charpy quien los incluye en su tratado de Anatomía (39). Tanto D. Gerota como HWG. Waldeyer hicieron referencia a los trabajos de Jonnesco en su propia descripción de la fascia perirrectal (30).



**Figura 8. Relaciones anatómicas del recto y sus fascias en la pelvis. Tomado de (38)**

### **1.2.2.2 Fascia endopélvica parietal o presacra**

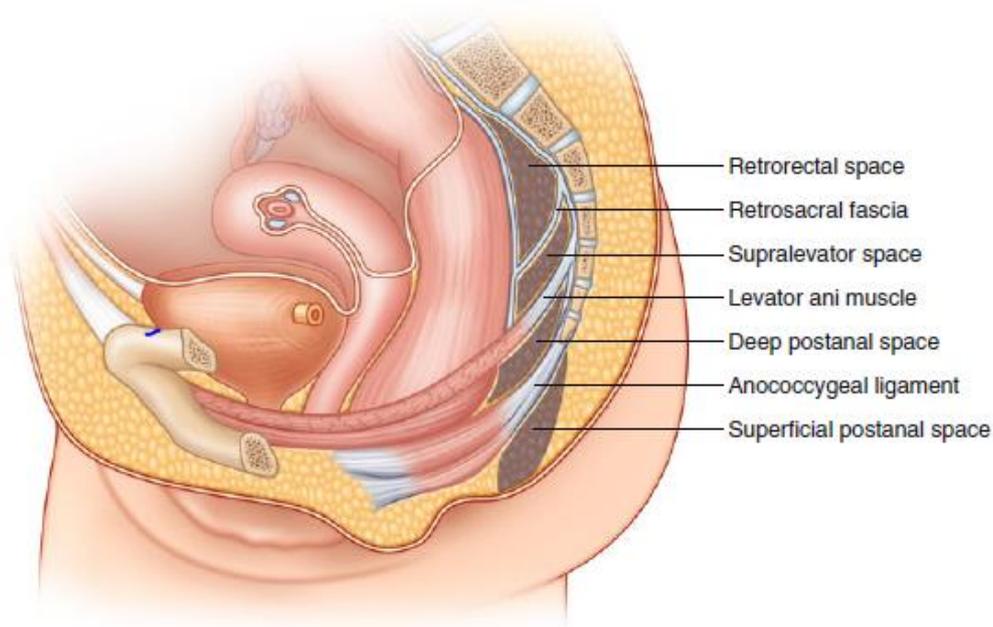
La fascia parietal o presacra es la porción de la fascia endopélvica parietal que se adhiere al periostio sobre el sacro y contiene las venas presacra y los nervios hipogástricos. Se extiende lateralmente para cubrir el músculo piriforme y el coxis superior. A medida que la fascia presacra se extiende lateralmente, se continúa con la fascia propia y contribuye a los ligamentos laterales del recto. En sentido caudal, la fascia se extiende hasta la unión anorrectal que cubre el ligamento anococcígeo (40) (Figura 8).

Los nervios autonómicos como el nervio hipogástrico inferior y el plexo pélvico se encuentran anatómicamente laterales a la fascia propia o mesorrectal, pero dentro de la fascia parietal. Conociendo además que el "plano sagrado" de una TME es un área avascular delimitada por las fascias mesorrectal y parietal, podemos afirmar que cuanto más cerca se realice la TME de la fascia mesorrectal, mayor será la probabilidad de preservación nerviosa y menor el riesgo de causar hemorragia presacra (38).

### **1.2.2.3 Fascia retrosacra, rectosacra o de Waldeyer**

A nivel de la tercera y cuarta porciones del sacro (S3-S4) (41) existe un tejido conectivo relativamente denso que une la fascia presacra y la fascia propia o mesorrectal (38). A este tejido se le denomina fascia rectosacra y se extiende hacia la cara posterior de la fascia propia a unos 3-5 cm de la unión anorrectal (42). El espacio posterior a la fascia retrosacra se denomina espacio supraelevador o retrorrectal (40) (Figura 9).

La fascia retrosacra también ha sido denominada fascia de Waldeyer, aunque este término ha sido utilizado para describir tanto la fascia presacra, la fascia retrosacra o toda la fascia posterior al recto. Si bien en la descripción original de Waldeyer de la fascia pélvica, no se hacía especial hincapié en el componente presacro (42,43), es necesario tener en cuenta que este epónimo tiene el potencial de significar fascia presacra, fascia rectosacra o retrorrectal (40).

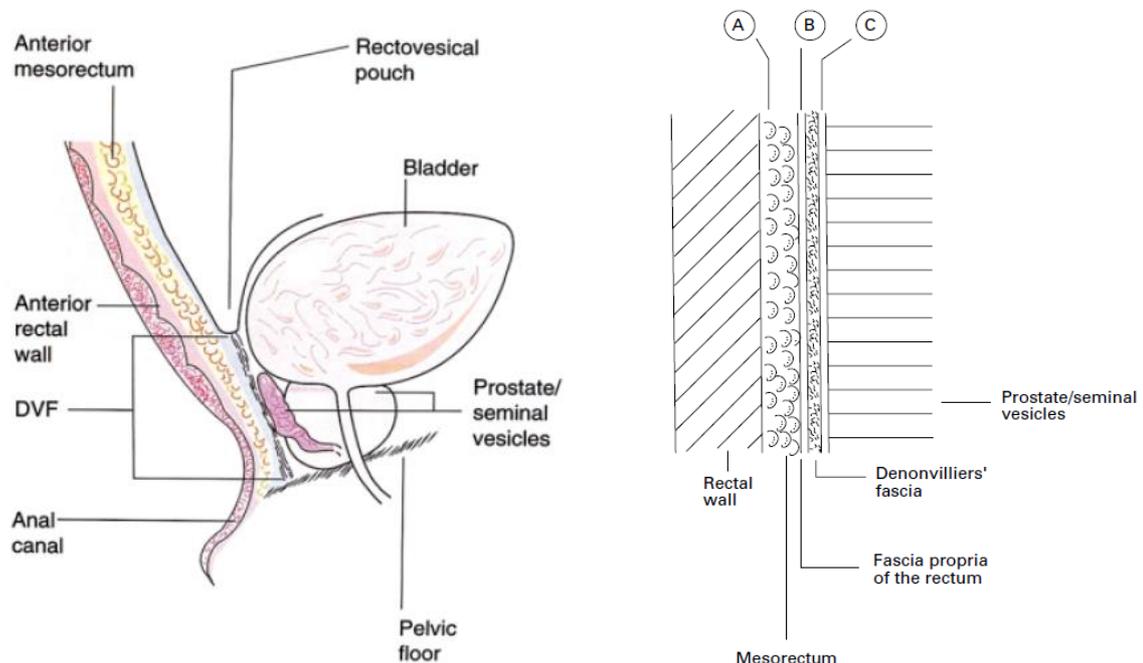


**Figura 9. Espacios perianales y perirrectales. Vista lateral. (Tomado de (40))**

#### 1.2.2.4 Fascia rectogenital o de *Denonvilliers*

La fascia de *Denonvilliers* (FDV) es una estructura anatómica derivada de la fusión de las dos paredes del fondo de saco peritoneal durante el desarrollo embriológico. Se extiende desde el punto más profundo de la bolsa rectovesical hasta el suelo pélvico (44). Originalmente descrita por Denonvilliers en 1836 (45) como una capa membranosa "prostato-peritoneal". En los hombres se encuentra situada posterior a la próstata y las vesículas seminales y anterior a la pared rectal extraperitoneal, el mesorrecto anterior y la fascia propia; entre el recto y las vesículas seminales (46) (Figura 10).

En las mujeres la FDV también está presente como parte del tabique rectovaginal y a veces se la denomina fascia rectovaginal (40). La FDV se fusiona con los ligamentos cardinales y útero-sacros de la pelvis. Lateralmente, se fusiona con la fascia endopélvica que recubre el músculo elevador y distalmente con el cuerpo perineal. En el plano rectal anterior, el mesorrecto está contenido por la fascia propia que se encuentra dorsal a la fascia de Denonvilliers. Los nervios cavernosos corren en haces neurovasculares en el borde anterolateral de la fascia de Denonvilliers (40).



**Figura 10. A) Representación de la fascia de Denonvilliers y relaciones.**

**B) Planos de disección. Tomado de (46,47).**

### **1.2.2.5 Suelo pélvico**

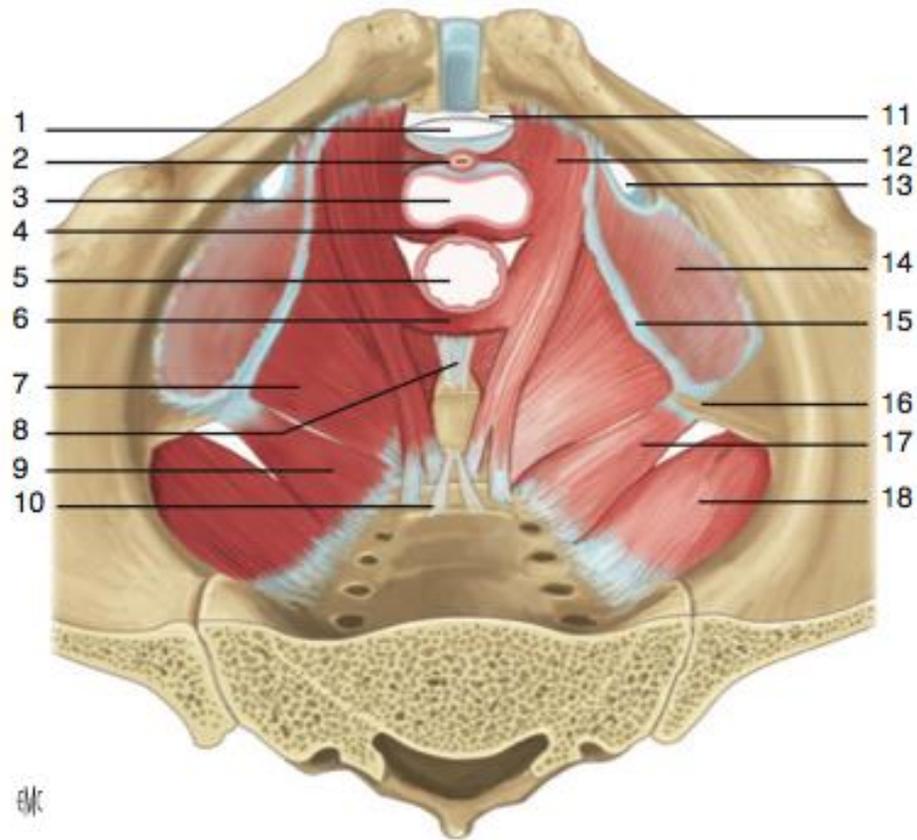
El suelo pélvico es una compleja estructura de músculos, fascias y ligamentos que se extiende desde la sínfisis pubiana hasta el coxis y desde una pared lateral a la otra. Presenta diversas funciones incluyendo el soporte de los órganos viscerales, el mantenimiento de la continencia, la micción y la evacuación, además de formar parte del canal del parto (48).

La pared interna de la pelvis está revestida por cuatro músculos pares. De atrás adelante son el músculo piriforme, el músculo coccígeo, el músculo elevador del ano y el músculo obturador interno. Los músculos coccígeo y elevador del ano forman un tabique cóncavo superiormente que recibe el nombre de diafragma pélvico separando la cavidad pélvica del periné. Este diafragma pélvico cuenta con dos hiatos, uno anterior (urogenital) y otro posterior (anal) que contiene la unión anorrectal (49). (Figura 11).

- a) El músculo coccígeo está constituido por una lámina muscular triangular situada posterolateralmente detrás del músculo elevador del ano, extendiéndose desde la espina isquiática hasta el borde lateral del sacro y coxis.
  
- b) El músculo elevador del ano es el músculo principal del diafragma pélvico. Tiene su origen en la sínfisis del pubis y termina en la espina ciática y el pubis. Está constituido por dos partes, una lateral o esfinteriana y otra medial o elevadora.
  - Porción lateral o esfinteriana: está compuesta por el músculo ileococígeo. Surge de la mitad posterior del arco tendinoso del músculo elevador del ano y se inserta:
    - a) en la cara posterior del pubis.
    - b) en la fascia obturatriz desde el orificio profundo del conducto obturador hasta la cara medial de la espina isquiática.
    - c) en la cara medial de la espina isquiática.

Desde su origen, los fascículos terminan a la altura de las dos últimas vértebras del coxis en la línea media del rafe anococcígeo, formado por la interdigitación de las fibras iliococígeas de ambos lados y cuya extensión abarca desde el coxis a la unión anorrectal (Figura 10).

La fascia obturatriz presenta un engrosamiento a lo largo de la inserción de las fibras del músculo elevador del ano denominado arco tendinoso del músculo elevador del ano (ATEA).



**Figura 11. Músculos del suelo pélvico. Tomado de (49).**

**Leyenda: 1. Hiato infrapúbico; 2. uretra; 3. vagina; 4. músculo pubovaginal; 5. recto; 6. fascículo puborrectal; 7. músculo iliococcígeo; 8. ligamento anococcígeo; 9. fascículo coccígeo; 10. ligamento sacrococcígeo ventral; 11. ligamento arqueado del pubis; 12. músculo pubococcígeo; 13. conducto obturador; 14. músculo obturador interno y su fascia; 15. arco tendinoso del músculo elevador del ano; 16. espina ciática; 17. músculo coccígeo; 18. músculo piriforme.**

- Porción medial o elevadora: se divide en tres vientres:
  - Pubovisceralis (*pubovaginal* en mujeres y *puboprostático* en hombres): se inserta en la cara posterior del pubis formando un cabestrillo en forma de U alrededor del hiato urogenital (Fig. 10). La contracción del *pubovisceralis* levanta y comprime el hiato urogenital. En ocasiones se le considera parte del puborrectal.

- Puborrectal: es el vientre principal del elevador del ano. Se inserta en la cara posterior del pubis desde donde rodea al recto entrelazando sus fibras con el músculo contralateral y la parte superior del ano donde se une al ligamento anococcígeo.
- Pubococcígeo: surge de la mitad anterior del arco tendinoso y del periostio de la superficie posterior del hueso púbico en el borde inferior de la sínfisis púbica. Sus fibras dirigidas posteriormente se insertan en el rafe anococcígeo y el coxis.

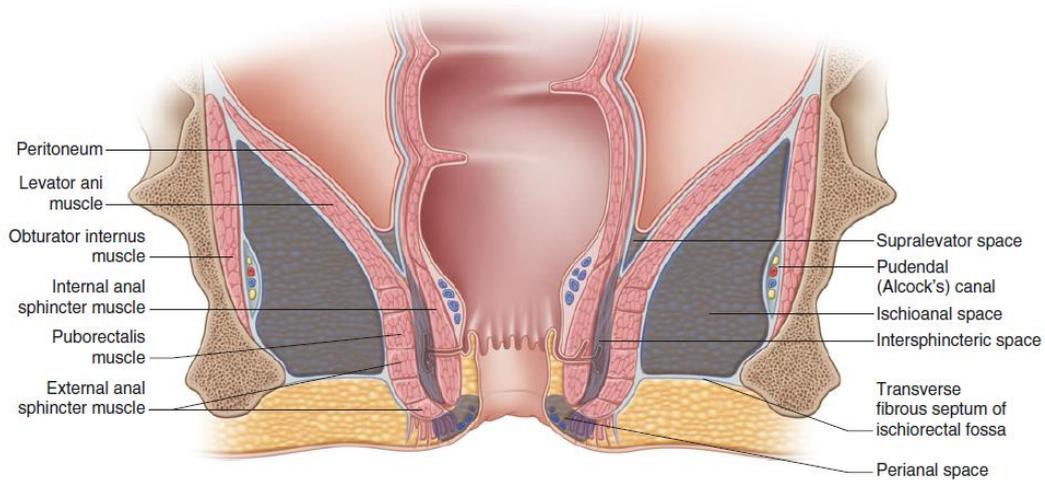
El músculo elevador del ano está inervado por ramas del nervio pudendo y los nervios S3 y S4. Los músculos pubococcígeo y puborrectal principalmente por ramas del nervio pudendo, como el nervio rectal inferior, mientras que el iliococcígeo está inervado fundamentalmente por los nervios sacros S3 y S4.

#### **1.2.2.6 Canal anal**

El canal anal es la última porción del tubo digestivo. Consta de una longitud aproximada de 3-4 cm y finaliza en el ano, que posee un aparato esfinteriano responsable de la contención y relajación durante el proceso defecatorio. El esfínter anal puede considerarse como una estructura cilíndrica de varias capas (48)(Figura 12):

- Esfínter anal interno: constituido por músculo liso continuación de la capa muscular propia del recto. Se extiende hasta aproximadamente 1 cm por encima del esfínter anal externo. Inervado a través de fibras simpáticas y parasimpáticas derivadas del plexo pélvico inferior y los nervios espláncnicos.
- El espacio interesfinteriano: situado entre el esfínter interno y la musculatura estriada externa, constituida por el esfínter anal externo y el músculo puborrectal. Contiene una capa longitudinal de músculo liso del recto.
- Esfínter anal externo: formado por músculo estriado cilíndrico y de control voluntario. Está inervado por la rama rectal inferior del nervio pudendo y la rama perineal del nervio sacro. Su regulación es en parte refleja y en parte voluntaria. El esfínter externo envuelve el espacio esfinteriano y se extiende aproximadamente 1 cm más allá del esfínter interno. La parte externa e inferior

del esfínter anal está formada por el esfínter externo, mientras que la parte externa y superior está constituida por el músculo puborrectal.

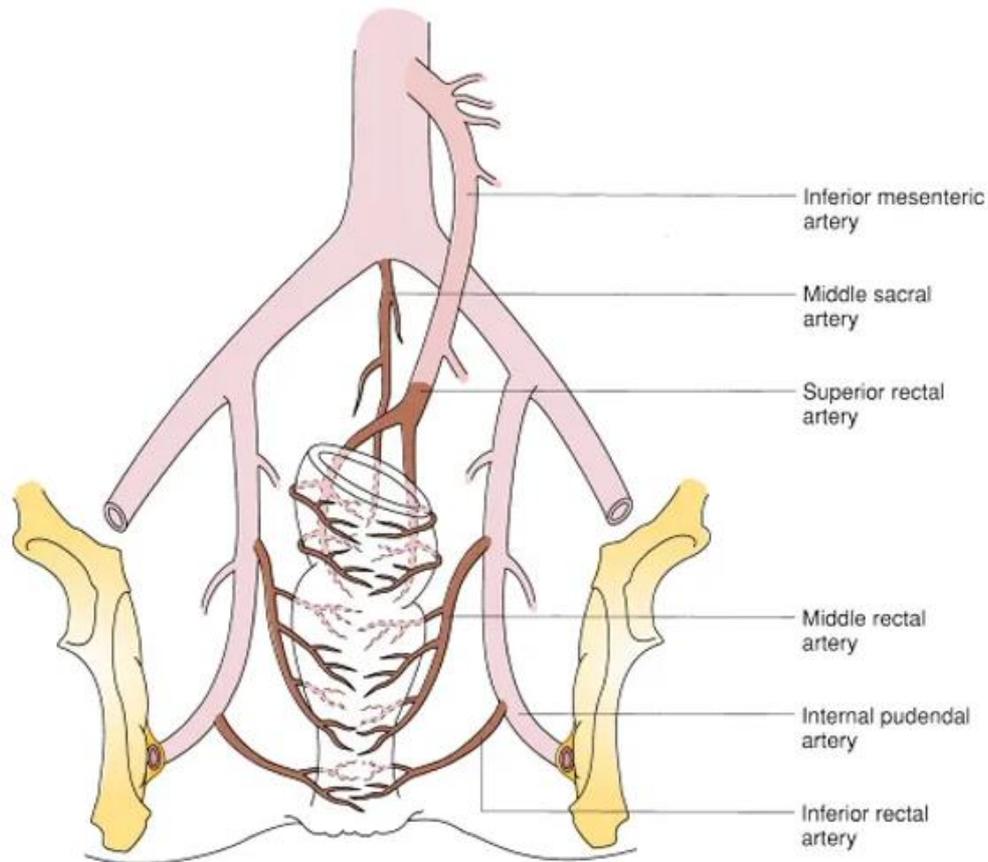


**Figura 12. Complejo esfinteriano perianal en la mujer. Tomado de (50)**

### **1.2.2.7 Vascularización e inervación**

El recto recibe su irrigación fundamentalmente de la arteria rectal superior, rama de la arteria mesentérica inferior que desciende para llegar a la parte posterior del tercio superior del recto, donde se bifurca en dos ramas. La rama izquierda irriga la superficie anterior del recto y permanece indivisible por la región lateral izquierda del recto. La rama derecha (más grande) irriga la parte posterior y lateral del recto y a su vez se divide en dos ramas principales; que irrigan las regiones anterior y posterior derechas del recto. Estas ramas generalmente se dividen a su vez en vasos más pequeños que penetran la capa muscular hasta llegar a la submucosa, finalizando habitualmente por encima de las válvulas anales formando un plexo capilar (25) (Figura 13).

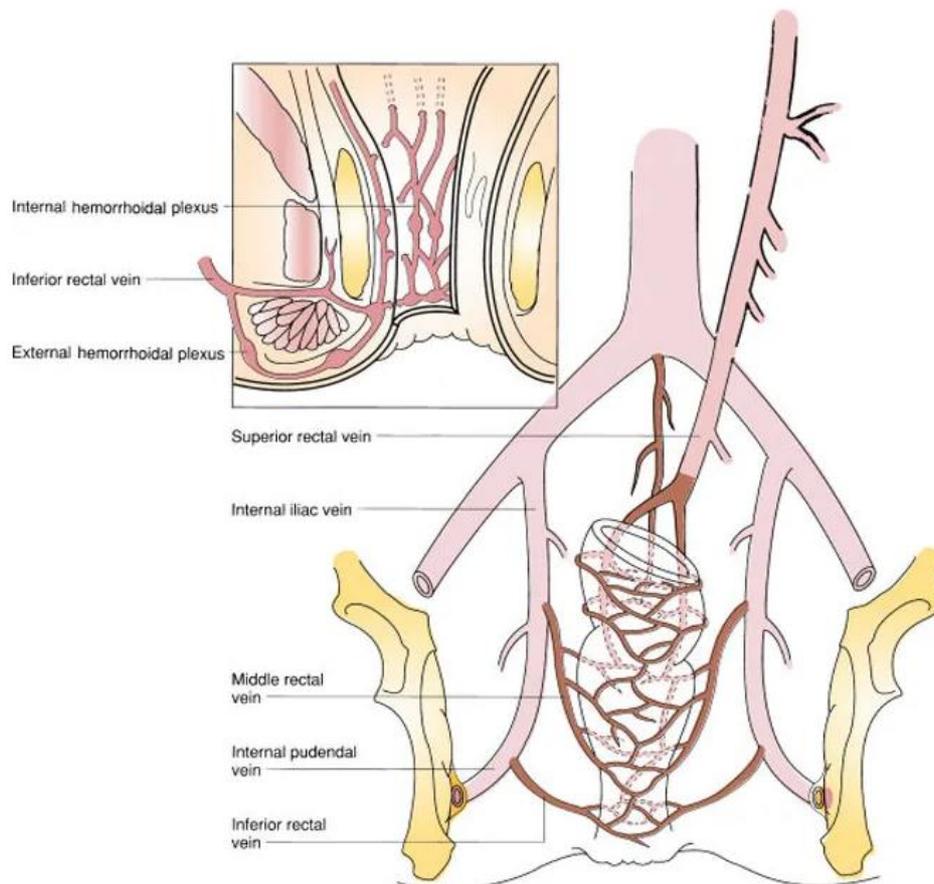
Las arterias rectales medias se originan en las divisiones anteriores de la arteria ilíaca interna o de sus ramas vesicales inferiores. Proceden medialmente y hacia adelante debajo del peritoneo pélvico, para alcanzar la pared donde pueden anastomosarse con las ramas de las arterias rectales superiores e inferiores. Las arterias rectales inferiores nacen de las arterias pudendas internas a nivel de la fascia del obturador interno. Desde allí se dirigen medial y ligeramente hacia adelante, dividiéndose en ramas que penetran los esfínteres anales externo e interno, hasta llegar a la submucosa del canal anal (25) (Figura 13).



**Figura 13. Arterias del recto y conducto anal. Varón. Visión posterior. Tomado de (51)**

El sistema de retorno venoso del recto sigue una distribución espejular al sistema arterial. Las venas rectales derivan de los plexos hemorroidales interno (intramural, sin válvulas) y externo (perirrectal, con válvulas). Desde aquí, el retorno venoso de los dos tercios superiores del recto corre a cargo de la vena rectal superior, que asciende paralelamente a la arteria hasta convertirse en la vena mesentérica inferior, la cual recibe la sangre venosa del colon descendente, colon sigmoide y flexura esplénica antes de unirse a la vena esplénica formando finalmente la vena porta (52).

Respecto al tercio inferior del recto y la pared anal, la sangre venosa de los plexos venosos intramural y perirrectal drenan a las ilíacas internas por dos vías: las venas rectales medias drenan directamente en las venas ilíacas internas y las venas rectales inferiores lo hacen a través de las venas pudendas internas. La sangre venosa de las ilíacas internas terminará drenando en la vena cava inferior. Por tanto, la mucosa anal y la submucosa representan localizaciones de anastomosis venosas porta-sistémicas naturales (52) (Figura 14).

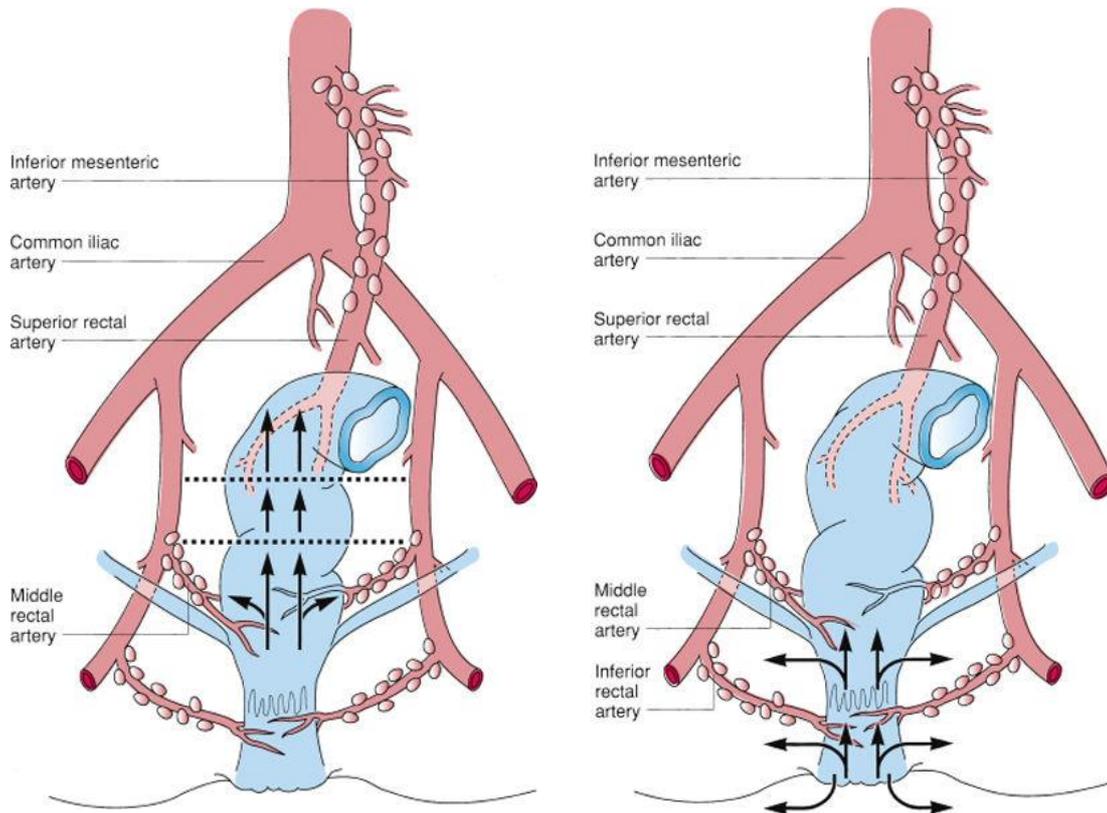


**Figura 14. Venas del recto y conducto anal. Mujer. Visión anterior. Tomado de (51)**

El drenaje linfático discurre paralelo al trayecto de los vasos sanguíneos, dando lugar a tres troncos: inferior, medio y superior. El tronco superior sigue el trayecto de la arteria rectal superior hacia la arteria mesentérica para drenar en los ganglios abdominales (53). Los troncos medio e inferior drenan a los ganglios ilíacos internos.

La región del ano proximal a la línea dentada sigue un drenaje dual, tanto por la vía de los ganglios linfáticos de la íliaca interna e íliaca común como por la de los ganglios de la arteria rectal superior hacia los mesentéricos inferiores. El drenaje del ano distal a la línea dentada (incluyendo piel del conducto anal y de la región perianal) lo realizan conductos linfáticos que drenan a ganglios linfáticos inguinales (54) (Figura 15).

El recto y el canal anal poseen una inervación somática a cargo del nervio pudendo y sus ramas, y una inervación autonómica por el sistema nervioso vegetativo (simpático y parasimpático). Podemos distinguir:

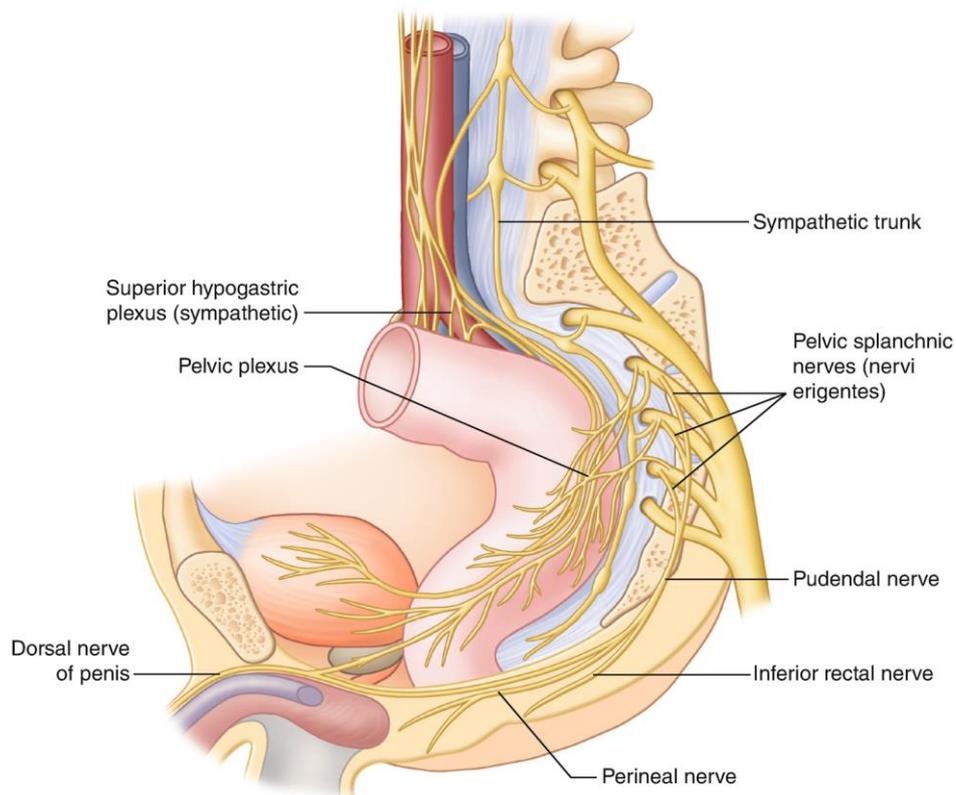


**Figura 15. Drenaje linfático del recto y canal anal. Tomado de (51)**

- **Inervación simpática:**

- Recto superior: desde L1, L2 y L3, las fibras nerviosas atraviesan las cadenas simpáticas y se unen al plexo aórtico. Desde allí, siguen el recorrido de la arteria mesentérica inferior hasta el plexo mesentérico desde donde nacen ramas que inervarán la zona superior del recto (40).
- Recto inferior: la unión de múltiples fibras nerviosas procedentes del plexo aórtico y los ganglios lumbares confluyen formando el plexo hipogástrico superior, situado por delante del cuerpo vertebral L5 y el promontorio sacro y entre las dos arterias ilíacas comunes (55).

Desde el plexo hipogástrico superior, nacen los nervios hipogástricos principales, que al entrar en la pelvis se dividen en dos ramas derecha e izquierda. Estas ramas discurren por detrás y a los lados del recto hasta unirse con las fibras parasimpáticas del plexo sacro (nervios erectores) y formar el plexo pélvico o hipogástrico inferior (Figura 16). La lesión de los nervios simpáticos provoca incontinencia urinaria y alteración de la eyaculación.

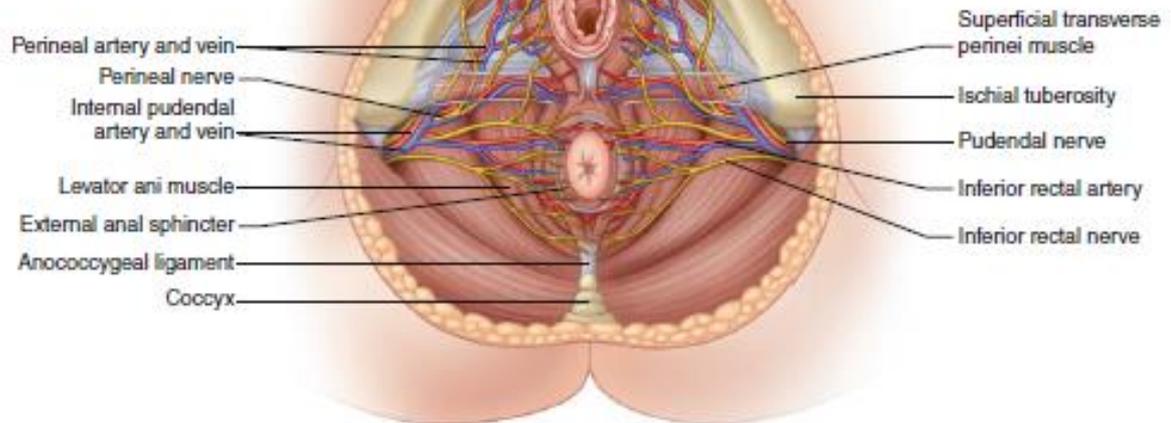


**Figura 16. Nervios del recto. Tomado de (40).**

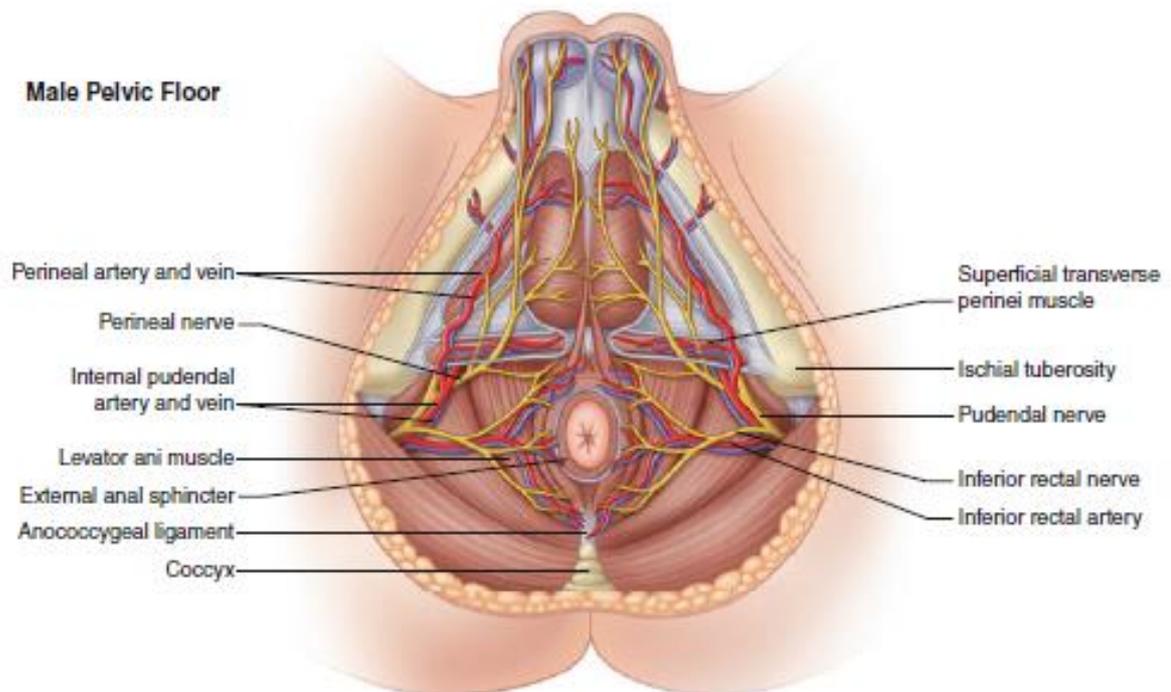
- Inervación parasimpática:** las fibras parasimpáticas del recto y el canal anal se originan en S2, S3 y S4 para penetrar a través del agujero sacro y se denominan *nervi erigentes* (nervios erectores). Estos nervios tienen un recorrido lateral y anterior para unirse a los nervios hipogástricos simpáticos y formar el plexo pélvico o hipogástrico inferior en la pared lateral pélvica. Desde aquí, las fibras nerviosas parasimpáticas y simpáticas mixtas post-ganglionares inervan el recto, los órganos genitales y el canal anal. La lesión de las fibras parasimpáticas puede provocar disfunción eréctil en el varón y anorgasmia en la mujer, así como vejiga neurógena y pérdida de lubricación de los órganos genitales externos en ambos sexos (40,55).

El esfínter anal interno está inervado por nervios simpáticos (L5) y parasimpáticos (S2, S3 y S4). El esfínter anal externo está inervado a cada lado por la rama rectal inferior del nervio pudendo interno (S2 y S3) y por la rama perineal de S4. La sensibilidad anal es recogida por la rama rectal inferior del nervio pudendo (40,55) (Figura 17).

### Female Pelvic Floor



### Male Pelvic Floor



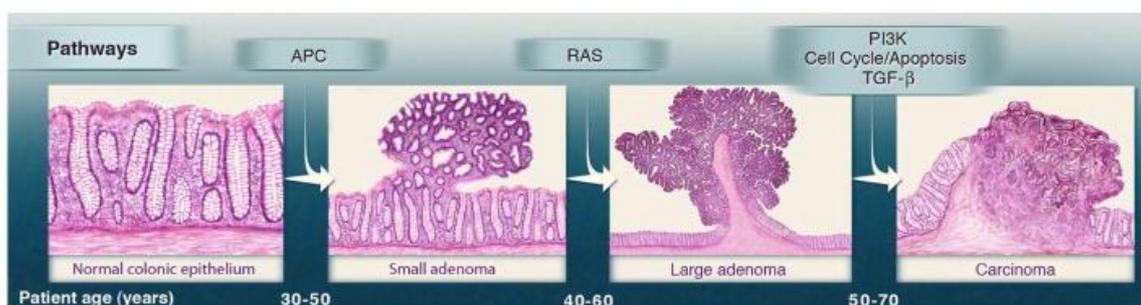
**Figura 17. Irrigación e inervación del suelo pélvico. Tomado de (40)**

### 1.3 Biología molecular del cáncer colorrectal.

#### 1.3.1 Modelo canónico de carcinogénesis en cáncer colorrectal

El CCR fue uno de los primeros tumores en ser caracterizado molecularmente. En 1988, *Bert Vogelstein* y *Eric Fearon* propusieron un modelo de tumorigénesis colorrectal basado en múltiples etapas (*stepwise model*), en las que la acumulación progresiva de eventos genéticos y epigenéticos generaba la formación de adenomas y carcinomas (56).

En este modelo gradual o escalonado (57), el CCR era el resultado de la activación mutacional de oncogenes (KRAS y PIK3CA) unida a la inactivación mutacional de genes supresores (APC, TP53 y SMAD4), confiriendo a la célula tumoral una ventaja selectiva en supervivencia y facilitando su progresión. La acumulación de estas mutaciones “*drivers*” o conductoras de la tumorigénesis, determinaría la desregulación de las vías que modulan la diferenciación celular, la apoptosis y la proliferación, definiendo las características biológicas del tumor (58) (Figura 18).



**Figura 18. Alteraciones genéticas y progresión a cáncer colorrectal. Tomado de (58)**

El proceso de mutaciones y expansión clonal posterior continúa gracias a las mutaciones en genes como PIK3CA, SMAD4 y TP53 generando en ocasiones un tumor maligno con capacidad de invadir la membrana basal y potencialmente generar metástasis ganglionares y a distancia. Estudios genómicos han demostrado que las alteraciones en las vías WNT- $\beta$ -catenina, EGFR, TGF $\beta$ , así como en las vías efectoras de señalización MAPK y PIK3CA también son eventos muy extendidos en el CCR (59).

Los autores concluyen que la acumulación no aleatoria de mutaciones genómicas inicia la carcinogénesis colorrectal mediante la desregulación de “*pathways*” que modulan la diferenciación celular, proliferación y apoptosis. Los defectos moleculares son por tanto de dos tipos: las que provocan un aumento de la función o el número de los oncogenes y las que provocan una pérdida de la función de los genes supresores (Tabla 6) (60).

<b>Tabla 6. Mutaciones somáticas recurrentes seleccionadas en oncogenes y genes supresores. Adaptado de (60)</b>		
<b>Gen</b>	<b>Tipo de mutación</b>	<b>Frecuencia estimada de alteraciones</b>
<b>Oncogenes</b>		
KRAS	Mutaciones puntuales (codones 12, 13 y 61)	40% (>75% en codón 12)
NRAS	Mutaciones puntuales (codones 12, 13 y 61)	<5%
PIK3CA	Mutaciones puntuales activadoras de kinasas	15-25%
BRAF	Mutaciones puntuales activadoras de kinasas	5-10% (ligadas a CCR CIMP-positivas)
EGFR	Amplificación génica	5-15%
CDK8	Amplificación génica	10-15%
CMYC	Amplificación génica	5-10%
HER2	Amplificación génica	<5%
MYB	Amplificación génica	<5%
<b>Genes supresores</b>		
p53	Mutación puntual, pérdida alélica	60-70% (>95% mutaciones missense)
APC	Mutación puntual, delección, pérdida alélica	70-80% (mutaciones → proteína truncada)
FBXW7	Delección, <i>nonsense</i> , <i>missense</i>	20%
PTEN	<i>Nonsense</i> , delección	10%
SMAD4	<i>Nonsense</i> , <i>missense</i> , pérdida alélica	10-15%
SMAD2	<i>Nonsense</i> , delección, pérdida alélica	5-10%
TGFBIIR	<i>Nonsense</i> , <i>frameshift</i>	10-15% (>90% MSI-H CCR con mutaciones)
TCF7L2	<i>Nonsense</i> , <i>Frameshift</i>	5% (mutaciones en MSI-H y en MSS)
ACVR2	<i>Frameshift</i>	10% (>80% MSI-H CCR con mutaciones)
BAX	<i>Frameshift</i>	5% (Con frecuencia 1 alelo en 50% MSI-H)

Por otro lado, las mutaciones pueden ser somáticas (es decir, en células somáticas de un individuo y por tanto sin capacidad hereditaria) o germinales (presentes en los gametos y por tanto heredables). En el caso de los CCR esporádicos, se requieren múltiples mutaciones somáticas independientes para iniciar la transformación de tejido normal a adenomas, así como mutaciones adicionales para su progresión a carcinoma.

En el caso de las mutaciones germinales, como ocurre con la poliposis adenomatosa familiar (FAP), la mutación germinal inactivadora del gen APC aumenta de manera significativa la formación de adenomas, pero se necesitan mutaciones adicionales independientes para el desarrollo de carcinomas.

Por el contrario, en el caso del CCR hereditario no polipósico, el paso limitante está en la transformación de adenoma a carcinoma, ya que a la mutación inactivadora en línea germinal de alguno de los genes del sistema de reparación del DNA (MMR) se une la inactivación somática del alelo restante producida en la transformación de epitelio normal a adenoma, lo que se traduce en una mayor tasa de mutaciones y progresión de adenoma a carcinoma (60) (Figura 19).

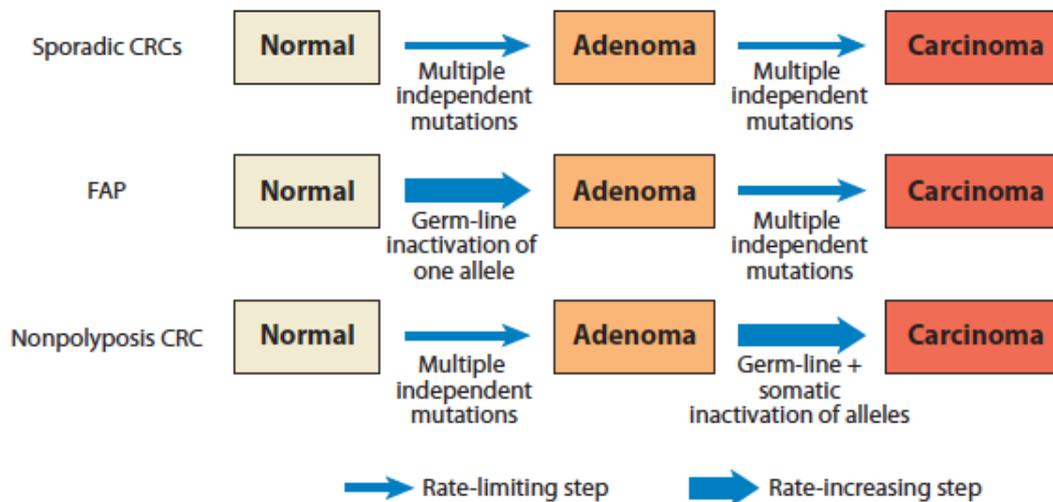


Figura 19. Mutaciones germinales en la génesis y progresión del CCR. Tomado de (60)

### 1.3.2 Oncogenes y genes supresores más relevantes en la génesis del CCR

#### 1.3.2.1 APC (Adenomatous polyposis coli)

APC es un gen supresor situado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q22.2) que codifica una proteína del mismo nombre que actúa en la vía de señalización celular Wnt/ $\beta$ -catenina. En ausencia de factores Wnt, la proteína GSK-3 $\beta$  (glucógeno sintasa kinasa-3 $\beta$ ) va a formar un complejo proteico junto con las proteínas APC, Wtx y axina. Estas proteínas se unen a la  $\beta$ -catenina y favorecen su fosforilación por GSK-3 $\beta$ , induciendo su degradación proteolítica vía ubiquitinización (61) (Figura 19).

Las proteínas Wnt actúan uniéndose a sus receptores "Frizzled", una familia de receptores proteicos acoplados a proteínas G, que se unen a su co-receptor LRP, activando a la proteína Dishevelled que suprime la actividad de GSK-3 $\beta$ . Esto impide la fosforilación y degradación de la  $\beta$ -catenina, que se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo celular, donde interacciona con la familia de factores de transcripción TCF/LEF (desplazando a la proteína supresora Groucho), facilitando la expresión de genes relacionados con la proliferación, la inmortalidad celular y la progresión del ciclo

celular (62). En el 80% de los CCR donde la APC está inactivada, están alteradas la fosforilación coordinada y la destrucción de la  $\beta$ -catenina (60) (Figura 20).

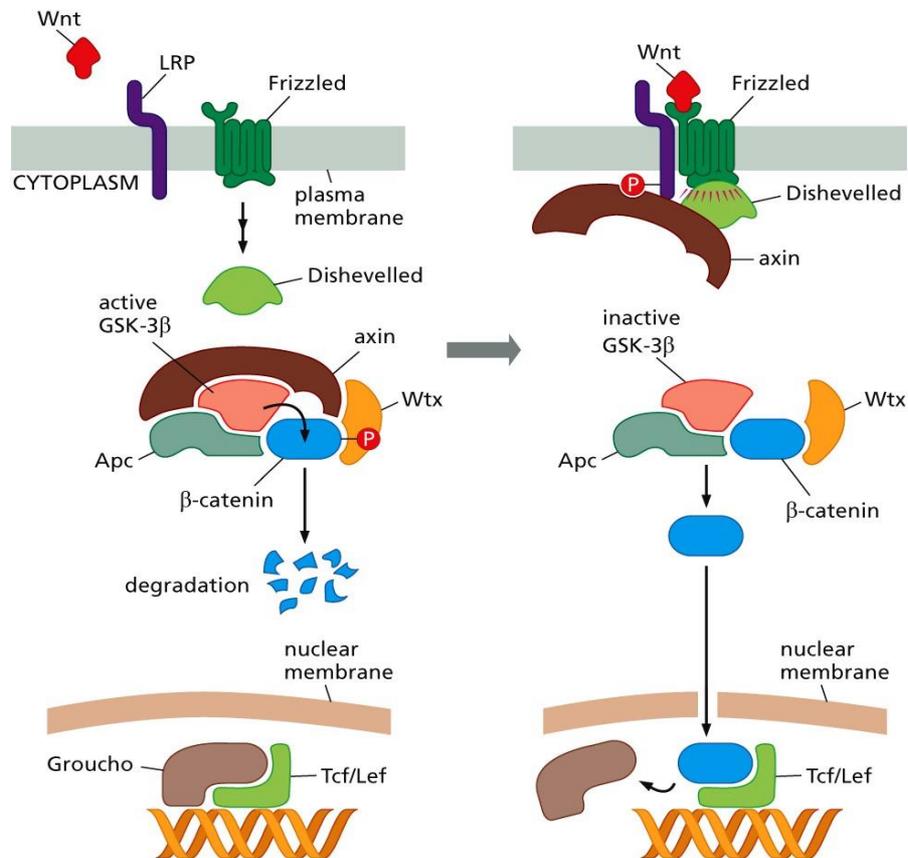


Figure 6.26b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

**Figura 20. Papel de la  $\beta$ -catenina en la vía Wnt. Tomado de (56)**

El gen APC es el más importante en la oncogénesis del CCR y su inactivación juega un papel esencial en la transición de adenoma a carcinoma, siendo considerado para muchos autores como el “guardián” del epitelio colorrectal normal (60). El gen APC puede inactivarse tanto por mutaciones somáticas como germinales (Figura 21).

- **Mutaciones germinales:** las mutaciones germinales en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (FAP) se producen en la región codificante de APC. El 95% de las mutaciones son *frameshift* o *nonsense* (3:1 *frameshift*). Todas ellas resultan en la síntesis de una proteína truncada. Dos “hot spots” en los codones 1061 y 1039 suponen el 35% de todas las identificadas. Las mutaciones en las regiones centrales (codones 1250 y 1464) se asocian con formas profusas de poliposis, mientras que las mutaciones cerca de los extremos N-terminal (codón 157) o C-terminal dan lugar a síndromes de poliposis atenuada (AFAP).

- Mutaciones somáticas: el 70-80% de los adenomas y CCR esporádicos tienen mutaciones somáticas que inactivan APC. Prácticamente todas las mutaciones somáticas dan lugar a formas truncadas de la proteína APC. Estas mutaciones son precoces y probablemente un evento limitante en el desarrollo de la mayoría de los adenomas. La frecuencia y distribución de las mutaciones somáticas en APC parecen predominar en la región *cluster* y las más frecuentes son las mutaciones en los codones 1309 y 1450 (Figura 21).

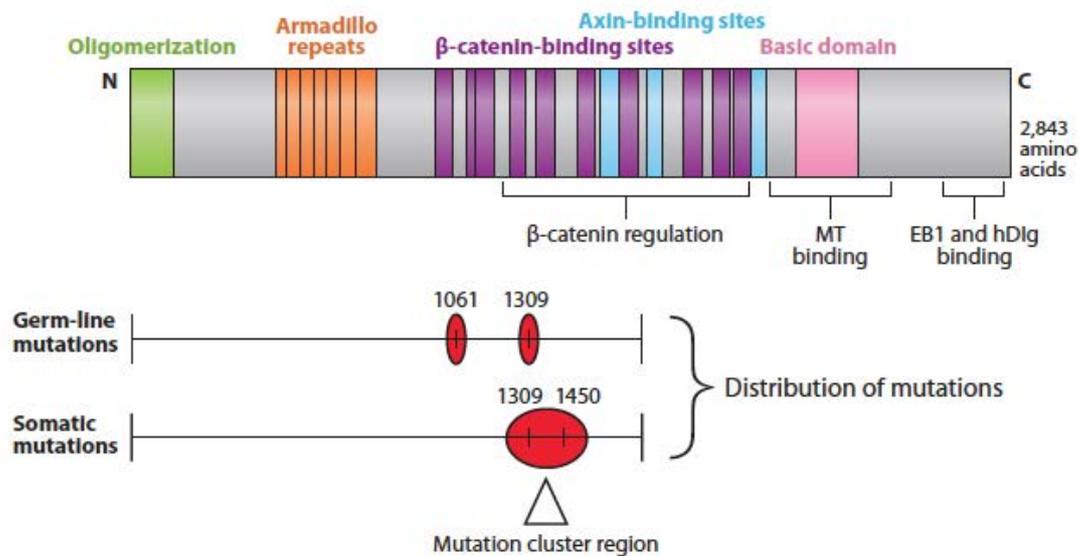


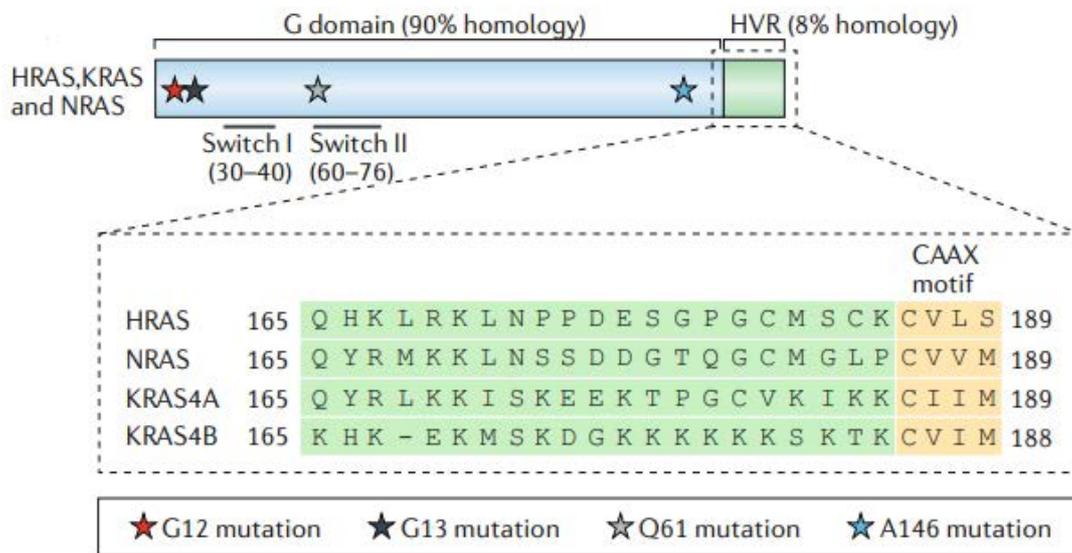
Figura 21. Proteína APC y distribución de mutaciones. Tomado de (56)

### 1.3.2.2 RAS (*Rat sarcoma virus*)

Los genes RAS son una familia formada por tres genes (HRAS, KRAS y NRAS) que codifican 4 proteínas distintas (2 especies de KRAS, una de NRAS y otra de HRAS) que se comportan como proteínas G, ya que todas ellas poseen actividad GTPasa. En humanos, los genes RAS están localizados en los cromosomas 11p15 (HRAS), 12p12 (KRAS) y 1p222 (NRAS) (63).

Los oncogenes RAS intervienen en diferentes vías de señalización regulando diferentes funciones celulares como el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia. Por este motivo los genes RAS se encuentran dentro los genes más frecuentemente mutados en cáncer, siendo KRAS el oncogén más frecuente (64) con una prevalencia aproximada del 20% de todos los tumores (61).

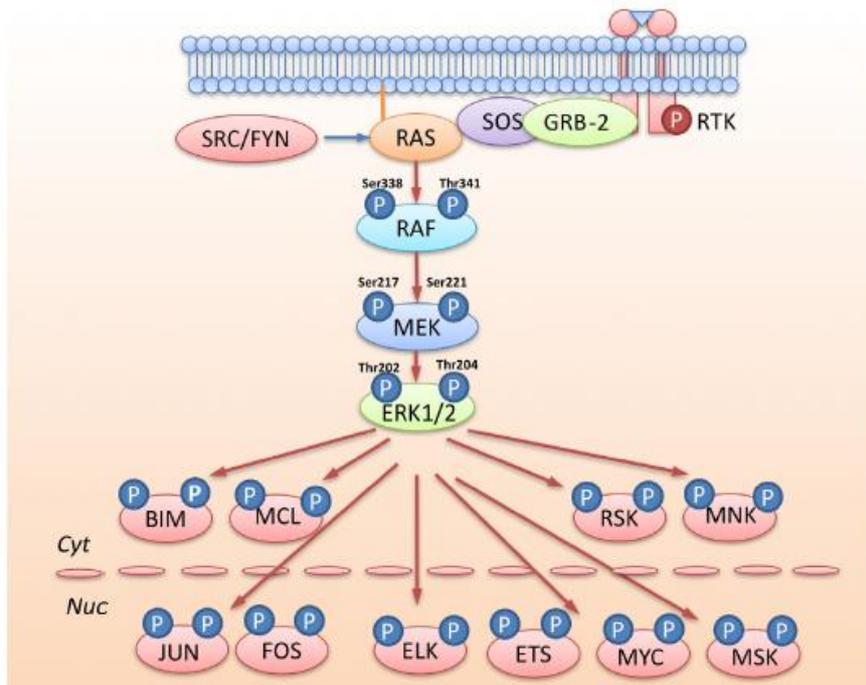
Por orden de frecuencia KRAS es el oncogén más mutado (85%), seguido de N-ras (11%) y H-ras (4%). Por localización, la frecuencia de “hot spots” mutados depende del tipo de tejido, pero globalmente, la mayoría de las mutaciones se localizan en: G12 (83% de mutaciones de KRAS), G13 (14% de las mutaciones de KRAS) y Q61 (63% de las mutaciones en NRAS) (64). Las proteínas RAS están formadas por un dominio G del cual comparten una elevada homología y una región hipervariable (HVR) más divergente que finaliza en un residuo terminal (CAAX). Los dominios Switch I y II son los responsables de la interacción con proteínas efectoras y que pueden verse afectadas por las mutaciones provocando la activación constitutiva de RAS (64) (Figura 22).



**Figura 22. Gen RAS. Estructura y distribución de mutaciones. Tomado de (64)**

En CCR, las mutaciones en RAS se producen generalmente tras las mutaciones en APC y se localizan fundamentalmente en los codones 12, 13 y 61 y son mutuamente excluyentes con las mutaciones en NRAS y BRAF (59), por lo que parece que comparten las mismas funciones regulatorias. Las mutaciones en RAS provocan una activación mantenida de la vía MAPK que, a través de una cascada de fosforilaciones, activará MEK y ERK (con sus respectivas isoformas 1 y 2), activando finalmente algunos factores de transcripción como FOS o JUN, estimulando la proliferación celular.

Desde el punto de vista práctico, las mutaciones de RAS confieren insensibilidad al tratamiento con los fármacos inhibidores de EGFR panitumumab (65) y cetuximab (62), ya que su lugar de actuación se encuentra en el receptor EGFR situado en la membrana plasmática, “aguas arriba” de la localización de RAS (Figura 23).



**Figura 23. Vía MAPK. Estructura y distribución de mutaciones. Tomado de (67)**

### 1.3.3 Vías moleculares de la carcinogénesis del CCR

Cada CCR tiene un perfil molecular único y distinto al resto. No obstante, existen al menos tres mecanismos moleculares de inestabilidad genómica que pueden generar un CCR: inestabilidad cromosómica (CIN), inestabilidad de microsatélites (MSI) y la hipermetilación del promotor de las islas CpG (CIMP). Aunque estos mecanismos pueden solaparse, el mecanismo dominante presenta un fenotipo característico (68).

#### 1.3.3.1 Inestabilidad cromosómica (CIN)

Como consecuencia de la acumulación de mutaciones, las células de un individuo pueden presentar variaciones en el número normal de cromosomas o alteraciones estructurales, ya sean deleciones, ganancias o translocaciones, dando lugar a ciertos grados de aneuploidía. Cuando se producen estos fenómenos, se dice que existe inestabilidad cromosómica.

Teóricamente, podemos definir la CIN como la adquisición progresiva de alteraciones genómicas que provocan una ganancia o pérdida de un cromosoma entero (W-CIN), o de aberraciones estructurales (S-CIN) que pueden oscilar desde mutaciones puntuales a alteraciones genómicas de pequeña escala y voluminosos reordenamientos cromosómicos. Existen términos similares en la literatura, pero con matices (69):

- Aneuploidía: presencia de un número anormal de cromosomas.
- SCNAs (*Somatic copy number alterations*): alteraciones en el número de copias somáticas. Incluye aneuploidias segmentarias, eventos focales y/o aneuploidias de cromosomas enteros.
- LOH (*Loss of heterozygosity*): pérdida de heterocigosidad. Fenómeno por el que un locus pierde una de las copias de un gen por delección u otro mecanismo.

En CCR, la CIN es el fenotipo más frecuente (70% de todos los CCR), destacando por su frecuencia la pérdida del brazo corto de los cromosomas 17 y 8 (17p y 8p) o los brazos largos de los cromosomas 5, 18 y 22 (5q, 18q y 22q) (70). La CIN proporciona a las células tumorales una eficiente manera de responder a la presión selectiva (60).

El modelo de carcinogénesis más aceptado hoy en día asume que la acumulación de mutaciones en una célula normal confiere a la célula en la fase más precoz del proceso un cierto grado de inestabilidad genómica. Esta inestabilidad provoca la aparición de nuevas mutaciones en oncogenes y genes supresores tumorales provocando un continuo caos cromosómico que favorece la progresión tumoral (71). De hecho, solo cuando la inestabilidad genómica coincide con mutaciones *driver*, es cuando los tumores se convierten en invasivos y forman macrometástasis (60).

### **1.3.3.2 Inestabilidad de microsatélites (MSI)**

Se denominan microsatélites a las secuencias cortas y repetitivas de DNA con una longitud que oscila desde una (mononucleótidos) a seis bases distribuidas a lo largo de regiones codificantes y no codificantes del genoma.

Los microsatélites son altamente polimórficos entre cada sujeto, pero su naturaleza repetitiva les hace especialmente sensibles a los errores por desajuste o "*mismatch*" durante la replicación del DNA como consecuencia de la tautomerización (apareamiento de las bases nitrógenadas A-T, G-C, T-A y C-G).

El sistema de reparación de estos errores se conoce como MMR (*Mismatch repair*) y es uno de los diferentes sistemas de reparación del DNA (72) (Figura 24).

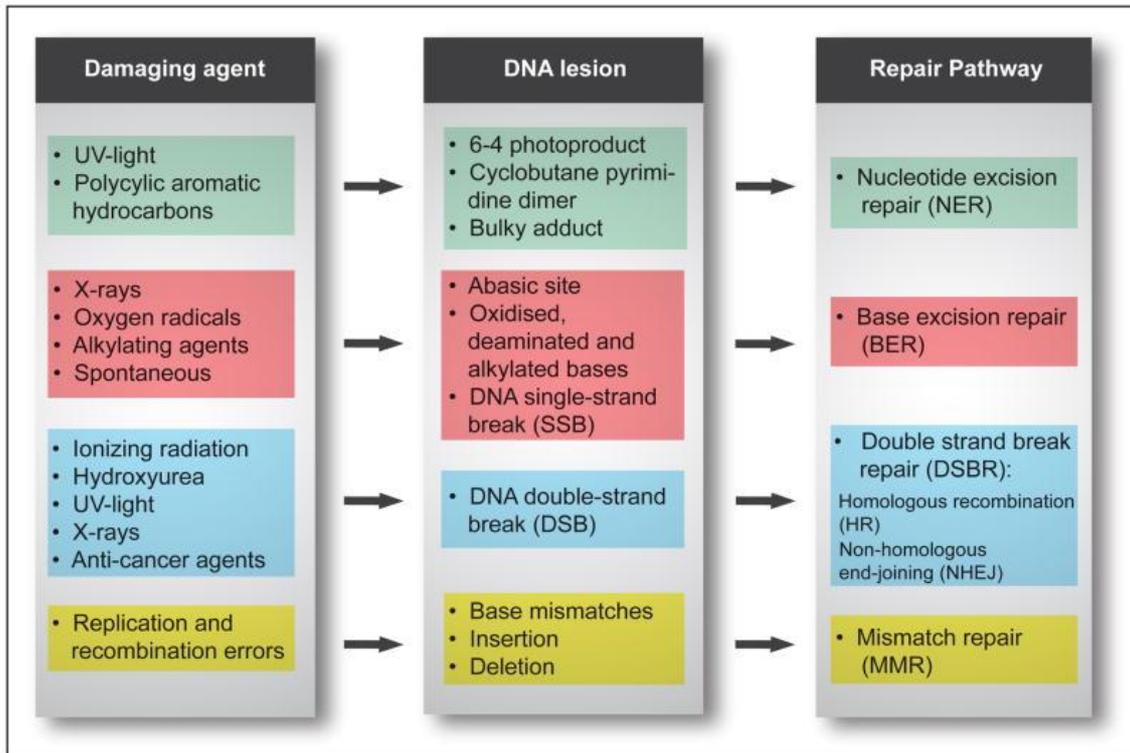


Figura 24. Principales sistemas de reparación del DNA. Tomado de (72)

El sistema MMR está formado por 4 proteínas (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2). Cuando se detecta un “mismatch” o desajuste, MSH2 se asocia con MSH6 y MLH1 se acopla con PMS2. El complejo proteico MutS y MuTL es el encargado de reconocer los errores “mismatch” y posteriormente la exonucleasa (EXO1) lo elimina. Posteriormente las DNA polimerasa  $\delta$  y ligasa realizan la resíntesis y reparación de la hebra de DNA (73) (Figura 25).

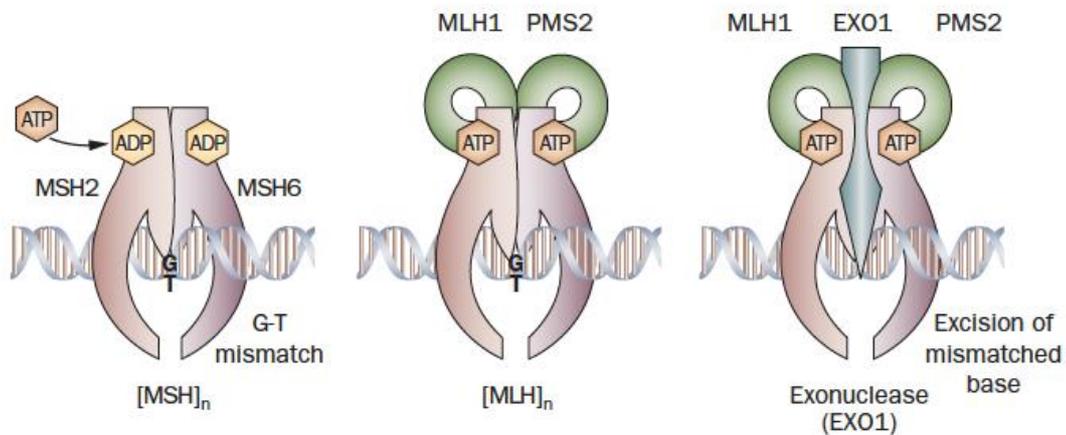
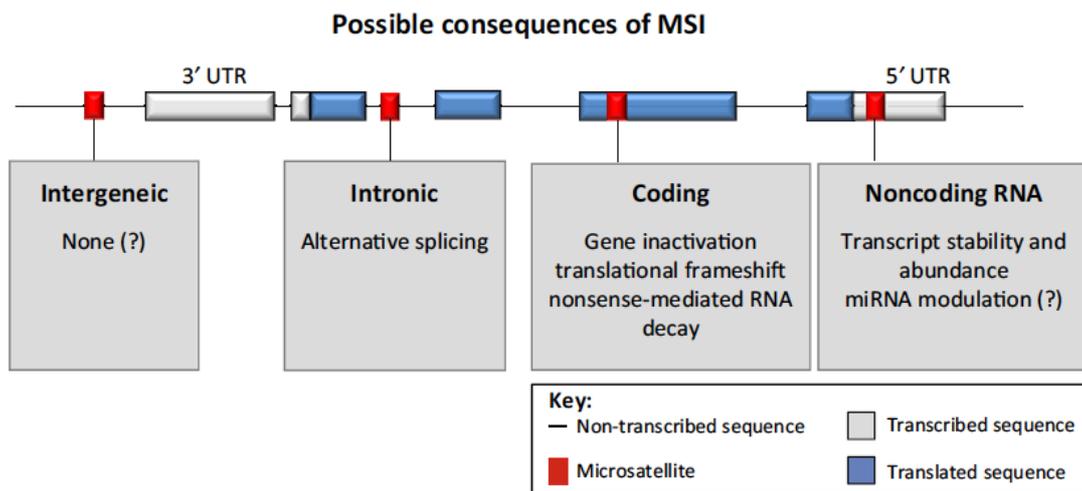


Figura 25. Mecanismo de reparación MMR. Tomado de (73)

Para poder entender el papel de la inestabilidad de microsatélites en la patogénesis tumoral es necesario conocer su localización en el genoma. La gran mayoría de los microsatélites se localizan en regiones intergénicas e intrónicas (es decir no transcritas ni traducidas) y, por tanto, sus errores *mismatch* no tienen consecuencias graves. Sin embargo, también existen microsatélites en regiones exónicas no codificantes y regiones codificantes de proteína (74) (Figura 26).

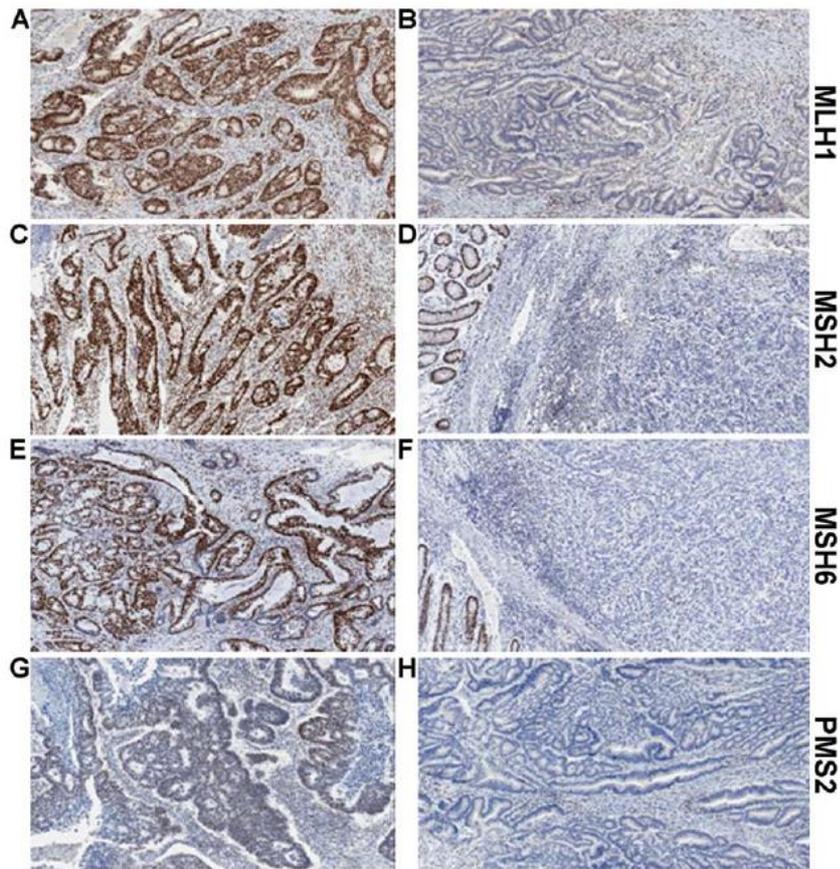


**Figura 26. Distribución de los microsatélites en el genoma humano. Tomado de (74)**

Las mutaciones en los genes de estas regiones pueden iniciar la transformación maligna de células deficientes en MMR no solo mediante la inhibición de proteínas supresoras de tumores, sino también estimulando la síntesis de nuevos péptidos antigénicos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune, lo que justificaría su sensibilidad potencial a los tratamientos de inmunoterapia (75).

El sistema MMR puede ser competente (*proficient – pMMR*) o deficiente (*deficient – dMMR*). Los tumores con una alteración en los genes del sistema de reparación (dMMR) presentan con frecuencia la pérdida completa de expresión de una o más de las proteínas reparadoras. Existen dos maneras de diagnosticar una MSI, la primera por inmunohistoquímica (IHQ) en el tejido tumoral, que nos permite conocer la expresión fenotípica de las proteínas reparadoras (76) (Figura 27).

Podemos determinar cuál de las proteínas reparadoras es la defectuosa atendiendo a la información que nos aporta el estudio inmunohistoquímico de las 4 proteínas (Tabla 7) y a las siguientes consideraciones:



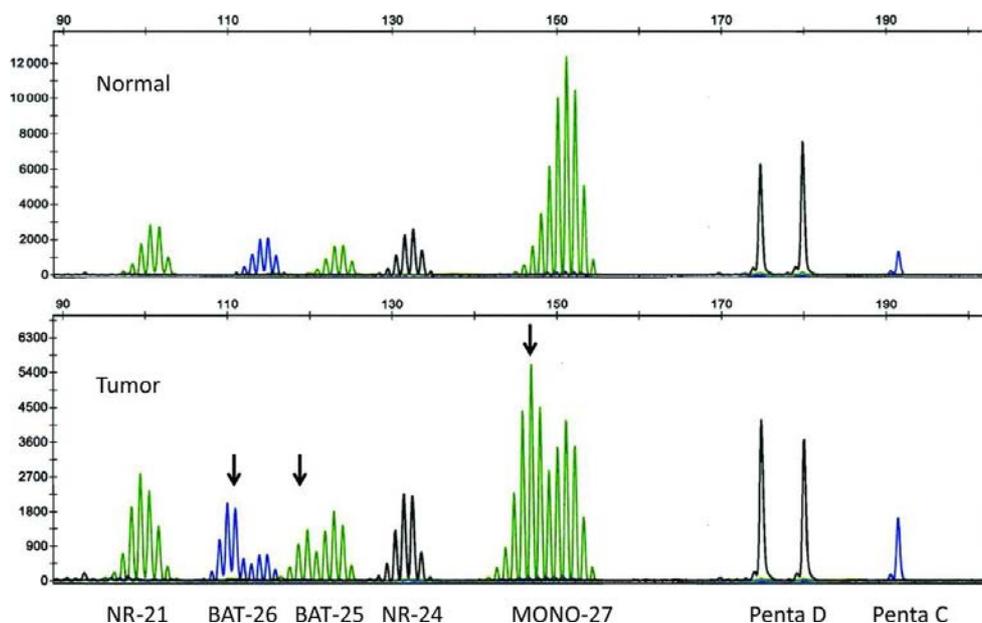
**Figura 27. Inmunohistoquímica que muestra la presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de expresión de cada una de las proteínas reparadoras MLH1 (A y B), MSH2 (C y D), MSH6 (E y F) y PMS2 (G y H). Reproducido de (76).**

- La pérdida de expresión de MSH2 y MSH6 es debida a una inactivación del gen MSH2, mientras que la pérdida exclusiva de MSH6 es indicativa de una alteración exclusiva del gen MSH6.
- De la misma manera, con PMS2 y MLH1, la pérdida de expresión combinada de ambos sugiere que el defecto radica en el gen MLH1, mientras que la pérdida solitaria de PMS2 es indicativa de un defecto exclusivo en el gen PMS2.
- La inactivación del gen MLH1 puede deberse a una mutación germinal o a la hipermetilación del promotor de MLH1, que es la causa más frecuente de la MSI en CCR esporádicos. Suele acompañarse de mutaciones en BRAF V600E.

<b>Tabla 7. Patrón inmunohistoquímico de las deficiencias en el sistema MMR. Adaptado de (73)</b>					
<b>Expresión IHQ Proteínas reparadoras</b>				<b>Gen inactivado</b>	<b>Microsatélites</b>
<b>MLH1</b>	<b>MSH2</b>	<b>MSH6</b>	<b>PMS2</b>		
<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Ninguno</b>	<b>MSS</b>
<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>MSH2</b>	<b>MSI</b>
<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>MSH6</b>	<b>MSI</b>
<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>PMS2</b>	<b>MSI</b>
<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>MLH1</b>	<b>MSI</b>

**MSS: estabilidad de microsatélites. MSI: inestabilidad de microsatélites.**

La segunda alternativa para determinar la MSI es la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los paneles recomendados por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) americano están formados por dos repeticiones de mononucleótidos (BAT-25 y BAT-26) y tres repeticiones de dinucleótidos (D5S346, D2S123 y D17S250). También existen kits de 5 mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, MONO-27, NR-21 y NR24). Los datos sugieren que existe una elevada sensibilidad y especificidad en la detección del fenotipo MSI-H cuando se utilizan solo los mononucleótidos (77) (Figura 28).



**Figura 28. PCR comparando DNA tumoral con DNA en sangre de un paciente con CCR. Tomado de (77)**

Cuando está disponible, se compara el DNA de la mucosa normal con el extraído del tumor. Sin embargo, la naturaleza de los marcadores de nucleótidos hace que no sea esencial tener DNA normal para realizar el test.

En función del número de marcadores que presentan la inestabilidad, diferentes estudios han clasificado la MSI en diferentes fenotipos tumorales (78,79):

- MSS: si ninguno de los marcadores muestra inestabilidad.
- MSI-Low (MSI-L): si únicamente uno de los marcadores muestra inestabilidad.
- MSI-High (MSI-H): si dos o más marcadores muestran inestabilidad.
- MSI: si los 5 marcadores presentan inestabilidad.

Con frecuencia MSS y MSI-L se clasifican como un solo subgrupo (tumores MSS), ya que muy pocos tumores MSI-L expresan en su fenotipo la pérdida de alguna de las proteínas MMR. La evidencia disponible sobre las diferencias fenotípicas entre los tumores MSI-L y MSS no es consistente, y probablemente se deba más a un tema de nomenclatura que a diferencias reales. De hecho, las alteraciones en los microsatélites de pacientes con MSI-L podrían estar más relacionados con la CIN que con la MSI (80).

Diferentes estudios que han comparado la correlación entre la IHQ y la PCR parecen sugerir que ninguna de las dos técnicas tiene una eficacia del 100% en la detección de MSI-H y que existe un elevado grado de concordancia entre ambas tecnologías, por lo que en la práctica clínica habitual se prefiere utilizar la IHQ (81). Una vez que se objetiva un patrón anormal de expresión del sistema de proteínas MMR, es fundamental determinar si el paciente tiene un síndrome de Lynch (LS) (82) (Figura 29).

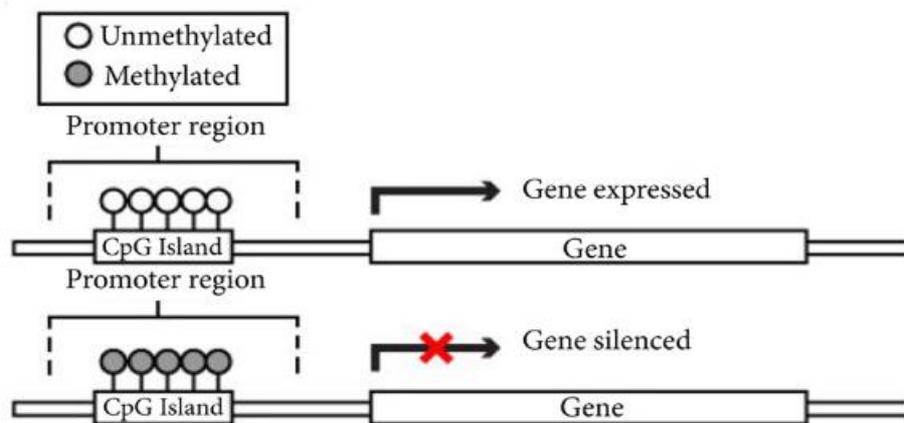
El perfil de expresión que con mayor frecuencia se asocia al LS es la pérdida conjunta de MLH1 y PMS2. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, esta alteración también se ha determinado en tumores esporádicos donde se ha producido la metilación de MLH1. La mutación de BRAF V600E se observa en aproximadamente el 70% de tumores que tienen pérdida de expresión de MLH1 y PMS2 o presentan metilación de MLH1, pero casi nunca se ha visto en tumores asociados a LS. Por lo que podemos afirmar que la presencia de mutaciones en BRAF se asocia de manera robusta con un defecto en el sistema MMR de origen esporádico. Del 12% de pacientes con CCR que presentan el fenotipo de MSI (70) solo uno de cada cinco se asocian a LS. Los cuatro restantes son esporádicos por hipermetilación del promotor del gen MLH1 (83).



### 1.3.3.3 Fenotipo metilador de las CpG island (CIMP)

El último mecanismo de inestabilidad genómica es el fenotipo metilador de las *CpG island* (CIMP), que está presente aproximadamente en el 18% de los CCR (70). Las *CpG island* son regiones genómicas de al menos 500 pares de bases ricas en Citosina y Guanina (>55%) localizadas en las regiones promotoras (regiones 5') de los genes. En la especie humana están presentes en el 40-50% de los genes (Figura 30).

La hipermetilación de estas regiones promotoras provoca la inactivación transcripcional de los genes supresores de tumores codificados en estas regiones. Este mecanismo de silenciamiento epigenético es responsable de la carcinogénesis (70,85).

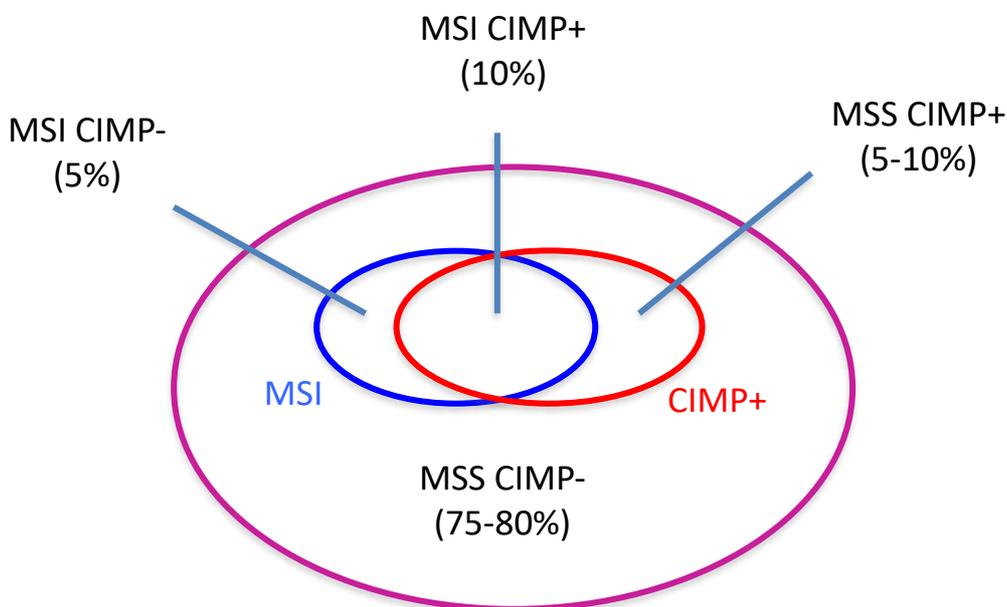


**Figura 30. Esquema simplificado de la metilación en las regiones promotoras de las islas CpG.**  
Tomado de (85)

Existe un solapamiento implícito entre el fenotipo metilador (CIMP) y la MSI. Los pacientes con CCR esporádico y MSI presentan un fenotipo metilador (CIMP+), mientras que aquellos con CCR asociado a LS no lo tienen (CIMP-). Esto es algo lógico, teniendo en cuenta que prácticamente todos los CCR esporádicos y con MSI presentan hipermetilación del gen MLH1, el cual está presente en un elevado porcentaje en todos los CCR con CIMP+ (86).

Algunos autores han definido cuatro subgrupos de CCR de acuerdo a su estatus de CIMP y MSI (70,86), siendo el más frecuente el MSS/CIMP- (75-80%), seguido del MSI/CIMP+ (10%), el MSS/CIMP+ (5-10%) y el MSI/CIMP- (5%). Esta clasificación molecular tiene su interés al reflejar los mecanismos de carcinogénesis subyacentes (Figura 31).

Diferentes estudios han evaluado el impacto pronóstico del fenotipo CIMP+ en CCR. Si bien parece que el subgrupo MSI/CIMP+ se asocia a peor supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) (87) fundamentalmente atribuido a la mutación en BRAF (88), en el subgrupo MSS/CIMP+ los resultados son contradictorios.



**Figura 31. Clasificación molecular del CCR según MSI y CIMP. Adaptado de (70)**

El CIMP puede clasificarse en tres subtipos en función del grado de hipermetilación, que puede ser alto (*High* - CIMP-H), bajo (*Low* - CIMP-L) o negativo (0 - CIMP-0); cada uno con unas características clínicas, moleculares y patológicas propias (89) (Tabla 8).

<b>Tabla 8. Características de los subtipos CIMP. Adaptado de (89)</b>			
<b>CIMP</b>	<b>CIMP-0</b>	<b>CIMP-L</b>	<b>CIMP-H</b>
<b>Localización</b>	Colon distal	Colon proximal	Colon proximal
<b>Sexo</b>	Indistinto	Hombres	Mujeres
<b>Pathway</b>	Canónica - Adenoma	Serrada o canónica	Serrada
<b>Mutaciones</b>	TP53	KRAS, TP53	BRAF
<b>Alteraciones Epigenéticas</b>	No metilación MLH1	No metilación MLH1	Hipermetilación MLH1
<b>MSI</b>	MSS	MSS	MSI
<b>CIN</b>	Positivo	Positivo	Negativo
<b>Pronóstico</b>	Variable	Bueno	Malo

### 1.3.3.4 Vía serrada de la carcinogénesis

Desde el punto de vista histopatológico, se cree que la mayoría de CCR con CIMP se desarrollan esporádicamente a partir de los pólipos/adenomas serrados/sésiles. Los adenomas serrados son un tipo de pólipo con una morfología mixta que combina áreas adenomatosas junto con otras hiperplásicas. Según la 5ª edición de la clasificación de neoplasias digestivas de la OMS (2019)(90), las lesiones serradas colorrectales se clasifican en distintos grupos (Tabla 9):

<b>Tabla 9. Clasificación OMS (2019) de las lesiones serradas colorrectales. Adaptado de (91)</b>	
<b>Tipo histológico</b>	<b>Subtipo histológico</b>
Pólipos hiperplásicos (HP)	- Tipo microvesicular (MVHP) - Tipo rico en células caliciformes (GCHP)
Lesiones serradas sésiles (SSL)	- SSL - SSL con displasia (SSLD)
Adenoma serrado tradicional (TSA)	
Adenoma serrado, inclasificable	

Los pólipos hiperplásicos (HP) son las lesiones serradas más frecuentes y suponen cerca del 75% de todos los pólipos serrados. Dentro de los HP, existen dos subtipos histológicos, el más relevante desde nuestra perspectiva, es la variante microvesicular (MVHP), cuyos pólipos son considerados precursores de las SSL (68). A nivel molecular, los MHVP se caracterizan por poseer mutaciones en BRAF, CIMP-H, sin hipermetilación de MLH1 y MSS.

Las lesiones serradas sésiles (SSL) tienen una prevalencia menor (5-10%) y se caracterizan por su potencial carcinogénico. El 4-8% de las SSL constituyen las SSLD, distinguiéndose tres tipos de displasia: intestinal (similar a la de los adenomas), serrada (más frecuente) y desviación mínima (similar a SSL asociando pérdida de MLH1).

El adenoma serrado tradicional (TSA) es la lesión serrada menos frecuente (<1%). Puede cursar con displasia intestinal o serrada y su potencial de malignización y progresión a carcinoma no está claro como consecuencia de su gran heterogeneidad tumoral (91).

La vía serrada puede seguir dos diferentes vías moleculares: la del CCR esporádico MSI y la del CIMP, considerada como su mecanismo principal. A diferencia de la vía canónica adenoma – carcinoma, las mutaciones inactivadoras de APC en la vía serrada son extremadamente raras (91). Atendiendo a las características moleculares y al tipo de lesión histológica podemos distinguir dos vías:

- **Vía Serrada sésil** (*Sessile Serrated pathway*): partiendo de la mucosa normal, las mutaciones en BRAF inducen la activación de la vía MAPK/ERK y la sobreexpresión de p16 e IGFBP7, que a su vez inducen la transformación del epitelio normal al pólipo hiperplásico (HMVP).

Posteriormente, la hipermetilación de los promotores de p16 e IGFBP7 (genes supresores) conduce a su inactivación y, por tanto, a la progresión de los HMVP a SSL. El siguiente paso es la progresión de SSL a SSLD, que puede seguir dos vías: la de la hipermetilación de MLH1 cursando con la expresión del fenotipo MSI, o la hipermetilación de otros genes distintos a MLH1 como el de MGMT (O<sup>6</sup> – metilguanidina – DNA – metiltransferasa) cursando con MSS.

El último paso de la transformación oncogénica se produce molecularmente merced a la inactivación de TP53, así como alteraciones en genes de la vía Wnt. La vía finaliza en dos tipos diferentes de CCR atendiendo a sus características clínicas, pronósticas y perfil molecular: el adenocarcinoma serrado (SAC) o el CCR esporádico con fenotipo MSI (89,91) (Figura 31).

- **Vía Serrada tradicional**: se inicia a partir de mutaciones en KRAS o BRAF que dan lugar a un TSA. Tanto KRAS como BRAF tienen capacidad de inducir CIMP, aunque BRAF tiene una mayor capacidad de metilación. Por eso los TSA con mutaciones en BRAF son habitualmente CIMP-H mientras los que tienen mutaciones en KRAS suelen ser CIMP-L. Los TSA con mutación en BRAF comparten muchas características moleculares. con los SSL y los HP.

La activación de la vía Wnt, conducirá al desarrollo de displasia de alto grado en los TSA (TSA-HGD), y finalmente, a medida que se producen la inactivación de distintos genes y se producen las mutaciones en TP53, su evolución final será el desarrollo de un CCR con MSS y mutaciones en KRAS o en BRAF, sin hipermetilación de MLH1 (89,91) (Figura 32).

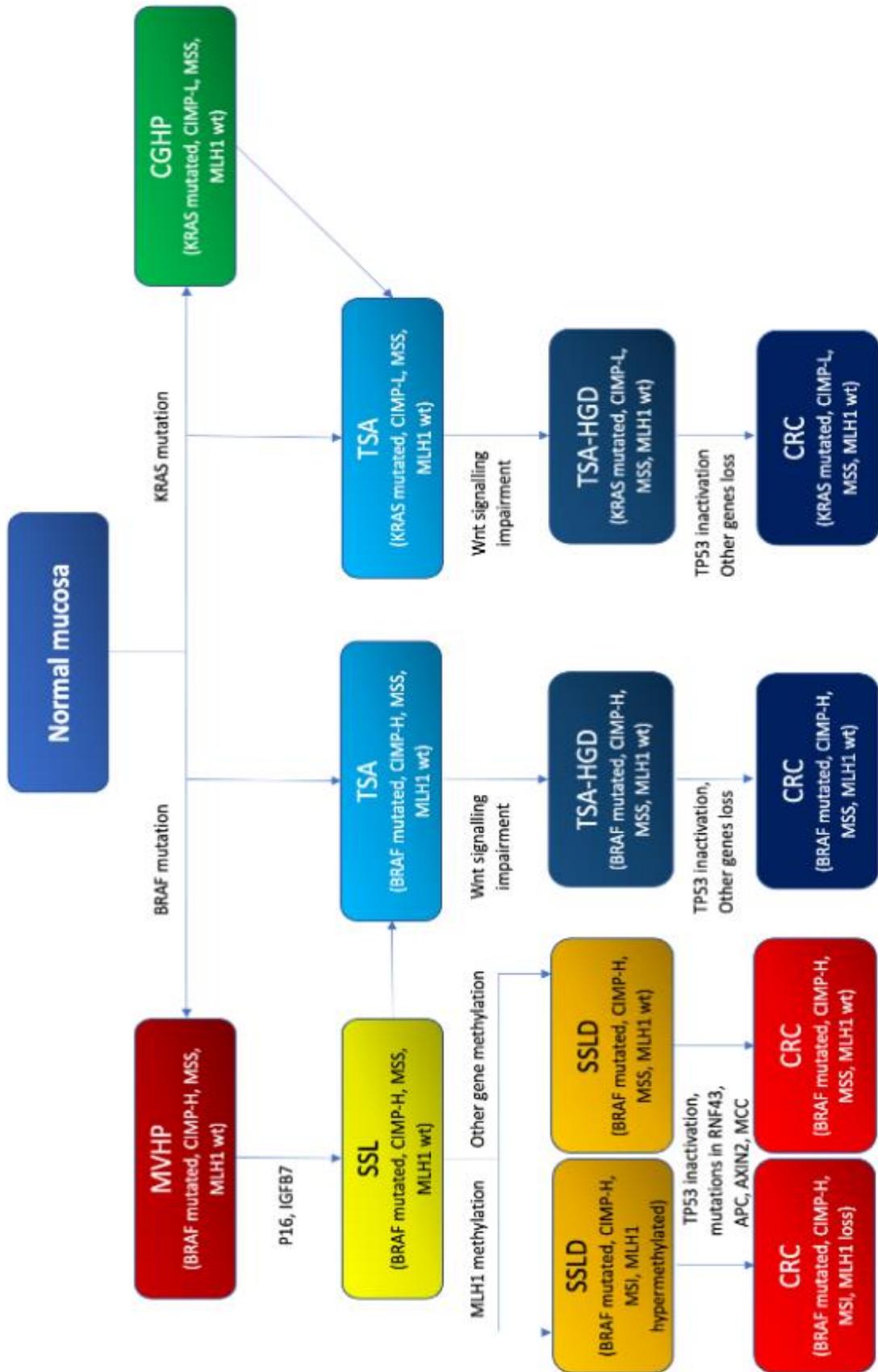


Figura 32. Vía serrada de la carcinogénesis. Tomado de (91)

### 1.3.4 Subtipos moleculares del CCR

En los últimos años, diferentes grupos de trabajo han intentado estratificar y clasificar molecularmente al CCR en función de sus mutaciones somáticas. El proyecto *Cancer Genome Atlas* (59) publicó en 2012 los resultados del análisis de 276 muestras de CCR en las que se estudiaron mediante diferentes plataformas la expresión de microRNAs y RNA mensajeros, la metilación del promotor, el número de copias del DNA (SCNA) y la secuencia exómica. El trabajo identificó dos grupos en función del número de mutaciones somáticas: hipermutados y no hipermutados (59) (Figura 33):

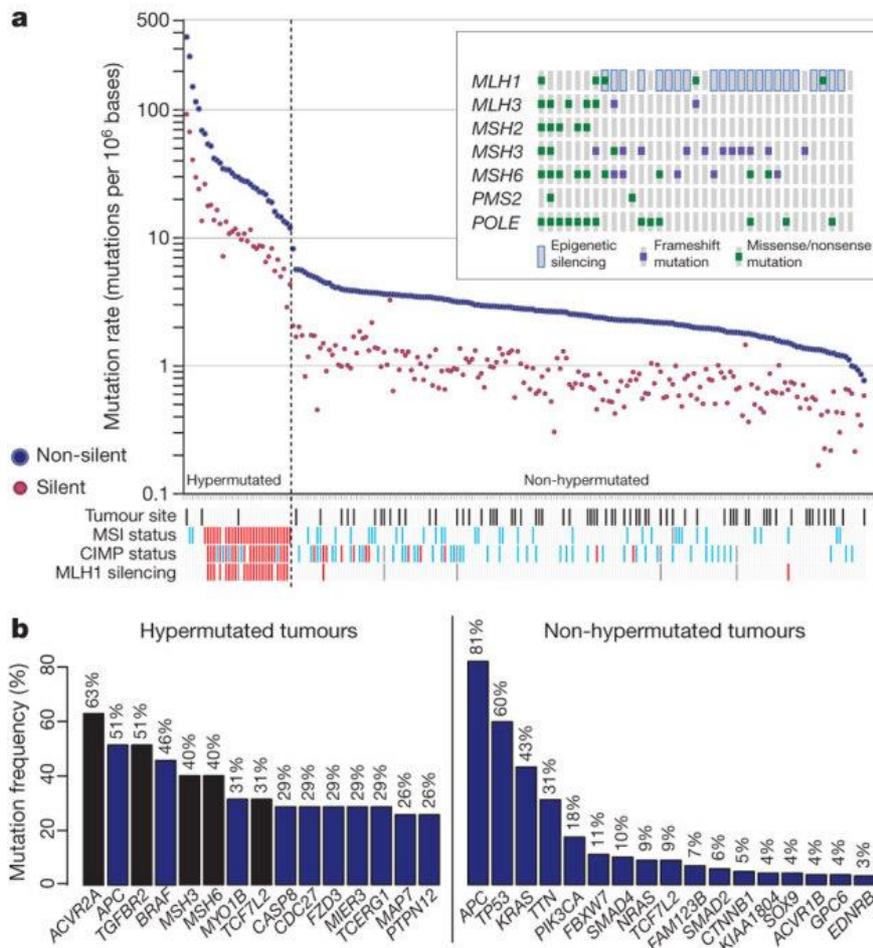


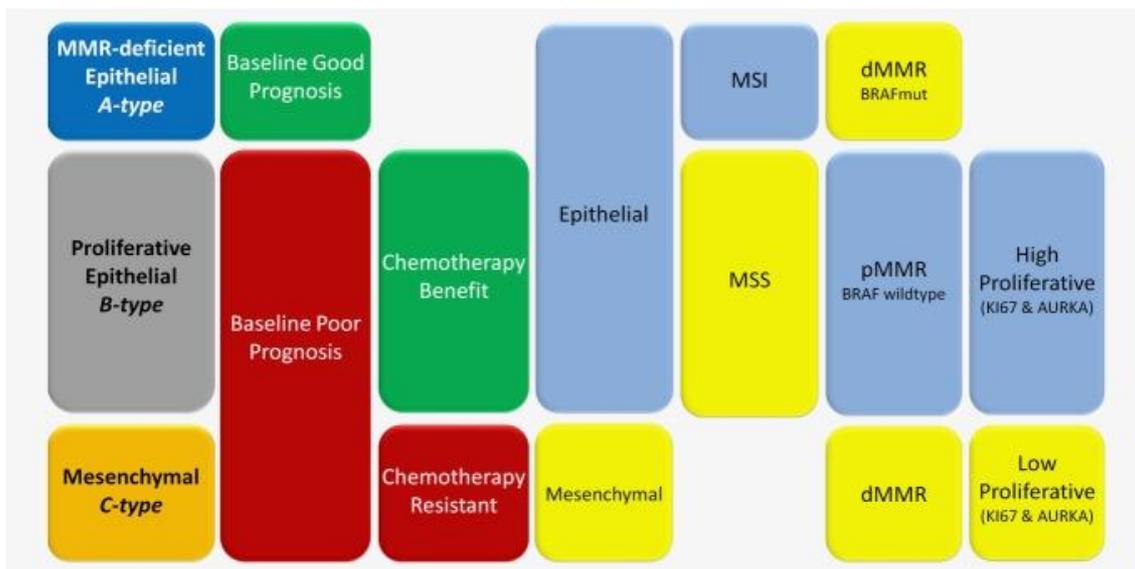
Figura 33. Mutaciones en CCR. Tomado de (59)

- En los hipermutados (16%) tres cuartas partes presentaban MSI generalmente con hipermetilación de MLH1, CIMP-H, un bajo SCNA y mutaciones en BRAF. La cuarta parte restante se denominaban ultramutados, ya que presentaban mutaciones “*proofreading*” en la polimerasa épsilon (POL $\epsilon$ ) o delta (POL $\delta$ 1) y transversiones C-A. Las mutaciones más frecuentes se daban en ACVR2A (63%), APC (51%), TGFBR2 (51%), BRAF (46%), MSH3 (40%) y MSH6 (40%).

- Los no hipermutados (84%), seguían la vía de la inestabilidad cromosómica con MSS, alteraciones de la vía Wnt y un alto SCNA. El patrón de metilación era CIMP-L y las mutaciones más frecuentes se producían en APC (81%), TP53 (60%), KRAS (43%), TTN (31%) y PIK3CA (18%), entre otros.

Otros trabajos se centraron en la búsqueda de subgrupos intrínsecos que permitieran seleccionar aquellos que más se beneficiaran de la quimioterapia. Un estudio multicéntrico con participación española analizó las muestras de 188 pacientes con CCR y los validó posteriormente de manera prospectiva en una cohorte de 543 pacientes con estadios II y III de CCR con el objetivo de evaluar el papel de la QT adyuvante. El análisis estableció tres grupos basados en las firmas de expresión génica (92) (Figura 34):

- Tipo A (*MMR-deficient Epithelial*): constituido por una firma de 32 genes. 20-30% de todos los CCR. Asociado a la histología epitelial y asociado a fenotipo MSI acompañado de defectos en el sistema de las proteínas reparadoras del DNA (*dMMR*). Se asocia con una elevada tasa de mutaciones (incluyendo BRAF). Presentan buen pronóstico de base. El beneficio de la quimioterapia adyuvante se limitaría a algunas indicaciones.
- Tipo B (*Proliferative Epithelial*): subtipo más frecuente (50-60%) formado por una firma de 53 genes asociado también a un fenotipo histológico epitelial con MSS (*pMMR*) y sin mutaciones en BRAF (*Wild Type*). Es el subtipo con peor pronóstico de base, pero el que más se beneficia de la quimioterapia adyuvante como consecuencia de su elevada capacidad proliferativa (medida por los niveles de expresión de Ki67 y AURKA).
- Tipo C (*Mesenchymal*): subtipo más pequeño pero el más característico desde el punto de vista molecular, asociado a una firma genética de 102 genes. Presenta un fenotipo mesenquimal, lo que destaca el papel de la transición epitelio – mesénquima (EMT) en el desarrollo y progresión del CCR. Se asocia con *dMMR*. Estas características, unidas a su baja capacidad proliferativa, justifican su pobre respuesta a la QT adyuvante y su mal pronóstico de base.



**Figura 34. Clasificación por subtipos CCR. Tomado de (92)**

Dados los diferentes estudios y plataformas con sus diferentes resultados, se creó un consorcio internacional que agrupó los resultados de 6 plataformas genómicas, cada una de ellas desarrollada independientemente y utilizando diferentes análisis genómicos (93). Se analizaron los datos de 4151 pacientes. El resultado fue una nueva taxonomía de consenso que intentaba reflejar las diferencias biológicas de los distintos subtipos moleculares basados en los perfiles de expresión génica.

- CMS1 o inmune: supone el 14%. Asociado a MSI, CIMP-H, mutaciones de BRAF y fenotipo hipermutado. Se asocia con infiltración y activación del sistema inmune. Más frecuente en mujeres y en colon derecho. Elevado grado histológico. Mal pronóstico en el caso de recaída.
- CMS2 o canónico: subtipo más frecuente (37%). Se asocia con un elevado SCNA y con activación de la vía Wnt y activación de MYC, genes implicados en la vía canónica de la carcinogénesis. La localización más frecuente en colon izquierdo. Mejor pronóstico tras recaída con un gran porcentaje de largos supervivientes.
- CMS3 o metabólico: engloban el 13% del total. Presentan un bajo SCNA y CIMP-L. Pueden tener fenotipo MSI/MSS. Se asocian a mutaciones en KRAS y a un “enriquecimiento” de los genes que regulan la adaptación metabólica.

- **CMS4 o mesenquimal:** segundo subtipo en frecuencia (23%). Asocia un elevado SCNA con la sobre-expresión de genes implicados en la EMT y de firmas génicas que regulan la infiltración del estroma, la activación de TGF- $\beta$ , la angiogénesis, la inflamación vía sistema del complemento. Estos tumores suelen diagnosticarse en estadios más avanzados (III y IV) y tienen el peor pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad y global (Figura 35).

CMS1 MSI Immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGF $\beta$ activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

**Figura 35. Subtipos moleculares de consenso del CCR. Tomado de (93)**

Finalmente, a pesar de identificar estos 4 subgrupos, el consorcio no consiguió clasificar un 13% de las muestras que presentaban características mixtas como consecuencia, según los autores, de la heterogeneidad tumoral o de un supuesto tránsito biológico entre fenotipos.

#### **1.4 Factores de riesgo y factores preventivos**

La mayoría de los estudios que examinan los factores de riesgo engloban al cáncer de recto como una misma entidad dentro del cáncer colorrectal. Si bien hoy en día se conocen las diferencias moleculares entre los tumores de colon proximales y distales (94,95) (que podrían traducirse en diferencias etiológicas en función de la localización) estas diferencias no son detectables cuando se combinan las estimaciones entre el recto, el colon proximal y distal.

No hay suficientes estudios epidemiológicos que nos permitan discriminar si existen diferencias etiológicas entre el cáncer de colon y el cáncer de recto. La evidencia disponible apunta a que ambas entidades comparten la mayoría de factores de riesgo, si bien la historia familiar parece tener un mayor peso en el cáncer de colon (96).

### **1.4.1 Factores de riesgo**

#### **1.4.1.1 Síndromes hereditarios asociados al CCR**

Actualmente, se considera que la predisposición genética debida a la presencia de variantes patogénicas en línea germinal supone entre el 2% y el 8% de todos los casos de CCR, alcanzando hasta el 6-10% si se consideran las mutaciones patogénicas de genes de alta y moderada penetrancia (97). En un estudio reciente, se detectaron hasta un 10% de mutaciones germinales responsables de un aumento de susceptibilidad a desarrollar un CCR, la mitad de las cuales se encontraban en genes no asociados previamente con el riesgo de CCR. Dentro de las alteraciones identificadas, se incluían mutaciones en genes de alta penetrancia (APC, MUTYH, PALB2, CDKN2A y TP53), y hasta un 1% de mutaciones en BRCA1/2 (98). A pesar de esta pléyade de genes, los síndromes hereditarios más comunes (Poliposis adenomatosa familiar y el síndrome de Lynch) constituyen únicamente el 5% de todos los casos de CCR.

El CCR hereditario no es, por tanto, una única enfermedad sino un grupo de enfermedades o síndromes con una alteración genética que da lugar a un síndrome fenotípico diferenciado de los demás. Desde el punto de vista fenotípico, podemos clasificar a los síndromes de CCR hereditario en:

- CCR hereditario no polipósico (HNPCC): síndrome de herencia autosómica dominante con una incidencia de entre un 1,7% y un 4,2% de todos los pacientes con CCR (99). Podemos dividirlo en dos subtipos en función del fenotipo molecular según presente o no alteraciones en los genes reparadores (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2), lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites (MSI). La pérdida de la actividad del sistema MMR (MMR-d) provoca la rápida acumulación de mutaciones, lo que genera un entorno genómico hipermutado que acelera la carcinogénesis (100). Algunos autores apuntan que el término "no polipósico" es quizás inapropiado, ya que casi todos los pólipos colorrectales pueden ser lesiones precursoras de un LS (101). Este grupo incluye el síndrome de Lynch y los espectos asociados al síndrome de Lynch:
  - Síndrome de Lynch (LS): es el más frecuente de todos los síndromes de CCR hereditarios. Todos los CCR asociados a LS presentan MSI, pero no todos los CCR con MSI se asocian a LS, ya que existe un subgrupo de CCR esporádicos con mutaciones somáticas en BRAF que provocan la hipermetilación del promotor de MLH1, conduciendo a la aparición de MSI.

La incidencia de estos CCR, con mutaciones en BRAF y MSI oscila entre el 46% y el 75%, y muestran una serie de características clínico-patológicas típicas, como una mayor frecuencia de afectación en mujeres de edad avanzada y una localización proximal (102). Los CCR asociados a LS se caracterizan por desarrollarse a una edad temprana y a localizarse en el colon derecho. Aproximadamente el 70% se originan en la flexura esplénica y hasta un 10% presentan CCR sincrónicos o metacrónicos durante el seguimiento.

La presencia de un LS confiere unas tasas de riesgo estimadas para desarrollar CCR a lo largo de la vida del 70% o el 40% para hombres y mujeres, respectivamente. Desde el punto de vista clínico, se caracteriza por un mayor riesgo de cáncer colorrectal, de endometrio, de ovario, de estómago y de intestino delgado. El adenocarcinoma de endometrio es el cáncer extracolónico más común en LS, con un riesgo de hasta un 60% en algunas familias portadoras, seguido por cánceres de ovario, intestino delgado, estómago, tracto urinario, páncreas y cerebro (101).

- Síndrome de Muir-Torre: síndrome infrecuente de herencia autosómica dominante con alta penetrancia y expresión variable, que se observa en aproximadamente el 9,2% de todos los HPNCC (103). Se caracteriza por la presencia de neoplasias sebáceas de la piel y el carcinoma de colon, que es la neoplasia maligna visceral más frecuentes (17). Además, todos los tumores extracolónicos asociados con LS también pueden ocurrir en el síndrome de Muir-Torre, así como las neoplasias malignas hematológicas y el cáncer de pulmón (104).
- Síndrome de Turcot: síndrome de herencia autosómica recesiva que suele dividirse en dos subtipos, en función de su expresión fenotípica, ya sea similar al LS (subtipo 1) o al síndrome de poliposis adenomatosa familiar (subtipo 2). Los pacientes con síndrome de Turcot tipo I presentan neoplasias hematológicas, manchas café con leche y gliomas, (particularmente glioblastoma multiforme) que se asocian fundamentalmente con mutaciones en MLH1 (101).

- Síndrome CMMRD (*Constitutional mismatch repair deficiency*): es un síndrome de cáncer hereditario de alta penetrancia producido por mutaciones bialélicas de la línea germinal en los genes de reparación de errores del DNA (MMR). (105). PMS2 es el gen mutado con mayor frecuencia en CMMRD, aunque son mutaciones infrecuentes o inexistentes en comparación con las mutaciones en PMS2 del LS. Todos los niños con CMMRD tienen manchas tipo café con leche y los tumores más frecuentes son los cerebrales (48%), seguidos de los gastrointestinales (32%) y los tumores hematológicos (15%). Afortunadamente, los tumores sólidos son en su mayoría de bajo grado y resecables (106).
  
- Síndrome de Lynch asociado a EPCAM: EPCAM es una glicoproteína transmembrana implicada en la mediación de la adhesión intercelular epitelial específica, en la señalización, migración, así como en la proliferación y diferenciación intracelulares (107). El gen EPCAM está situado aproximadamente 17 kb aguas arriba del gen MSH2, en el brazo corto del cromosoma 2. Las mutaciones bialélicas en EPCAM causan una enteropatía congénita causante de una diarrea crónica durante la infancia. Mientras que las deleciones monoalélicas de los últimos exones de EPCAM causan LS en el 1% al 3% de las familias afectadas. Algunos estudios sugieren que el 30% de los pacientes con tumores con mutación MSH2 negativa y el 20% de los pacientes con SL sin mutaciones MMR presentan deleciones de EPCAM que provocan LS (108). El LS asociado a EPCAM conlleva un riesgo de CCR similar al de los tumores con mutaciones MLH1 y MSH2, mientras que el riesgo acumulado de cáncer de endometrio es mucho menor siempre y cuando las mutaciones no afecten a la región promotora de MSH2, en cuyo caso el riesgo de cáncer de endometrio parece similar (109).
  
- CCR familiar tipo X: entre los pacientes con características clínicas de cáncer colorrectal (CCR) hereditario no polipósico, existe un grupo que engloba hasta el 40% de las familias que se caracteriza por cumplir los criterios de Amsterdam-1 (110) para el LS, pero presentan estabilidad de microsátélites (MSS), por lo que seguirían una vía de carcinogénesis diferente a la del síndrome de Lynch. Este grupo se denomina cáncer colorrectal familiar tipo X (FCCTX) (111). Los pacientes con FCCTX tienen un riesgo mayor de CCR al de la población general pero inferior al que confiere el LS. En comparación con el LS, las edades al diagnóstico son más tardías en la FCCTX (60 vs 50

años) pero las tasas de supervivencia son menores que las de los pacientes con LS (112). El riesgo de desarrollar tumores extracolónicos es bajo (113). Los genes causantes de FCCTX siguen sin estar bien definidos, aunque se han propuesto varios candidatos a través de ensayos basados en estudios de NGS.

- CCR hereditario asociado a poliposis (HPCC): la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y sus variantes [síndrome de Gardner, síndrome de Turcot tipo 2 y FAP atenuada (AFAP)] representan menos del 1% de los CCR.

- Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP): síndrome caracterizado por múltiples adenomas colorrectales con potencial carcinogénico (97). La FAP es debida a las variantes patogénicas en línea germinal del gen supresor APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21). Las mutaciones de APC en los extremos 3' y 5' del gen generalmente se asocian con un fenotipo atenuado. Los fenotipos varían en función del locus mutado, pudiendo clasificarse en función del número de adenomas colónicos detectados como profusa ( $\geq 1000$ ), clásica (100-999) o atenuada ( $< 100$ ) (101). Si bien la FAP muestra una herencia autosómica dominante, aproximadamente el 30% de los individuos afectados no tienen antecedentes familiares y representan mutaciones de novo (97).

En la FAP típica, la mitad de los individuos desarrollan adenomas colorrectales a una edad promedio de 16 años y el riesgo de CCR supera el 90% a los 45 años en ausencia de proctocolectomía. La AFAP se caracteriza por una poliposis adenomatosa con  $\leq 100$  adenomas colorrectales, de aparición más tardía y una mayor edad promedio de diagnóstico de CCR de 54 años y menos manifestaciones extracolónicas.

La mayoría de las personas con FAP también desarrollan manifestaciones extraintestinales como mayor riesgo de cáncer duodenal, cáncer de páncreas, cáncer papilar de tiroides, meduloblastoma y hepatoblastoma en niños menores de 5 años (100). Los tumores desmoides ocurren en entre el 15% y el 20% de los pacientes durante la segunda y tercera décadas de la vida, pudiendo ser una fuente de morbilidad y mortalidad significativas.

Otras lesiones benignas incluyen osteomas (20%), lipomas, quistes epidermoides, fibromas, anomalías dentales e hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina (CHRPE) (signo patognomónico para el diagnóstico de FAP) (101). También destaca el aumento de riesgo en el desarrollo de pólipos gástricos de las glándulas fúndicas así como de adenomas duodenales y ampulares que requieren vigilancia endoscópica continua (97). La presencia de FAP junto con la constelación de manifestaciones extracolónicas constituyen el denominado síndrome de Gardner.

- Poliposis asociada al gen MUTYH (MAP): es un síndrome de herencia autosómica recesiva asociado a variantes germinales bialélicas del gen MUTYH, localizado en el brazo corto del cromosoma 34 (1p34.1). Las personas con FAP pueden exhibir una amplia gama de fenotipos que incluyen poliposis clásica y atenuada. La MAP tiende a presentarse a edades más tardías (>25 años) en comparación con la FAP y se caracteriza por un aumento moderado (1,5- 2 veces) del riesgo de CCR y un mejor pronóstico que aquellos con CCR esporádicos (114). Aproximadamente 1/3 de las personas con mutaciones MUTYH bialélicas desarrollan CCR en ausencia de poliposis, lo que sugiere una penetrancia incompleta. El espectro de lesiones extraintestinales en la enfermedad asociada con MUTYH difiere mucho del observado en FAP, y es bastante más similar al de LS, con un riesgo significativamente mayor de tumores de ovario, endometrio, vejiga y piel (115). Otras características extracolónicas comunes de la FAP, como los pólipos de las glándulas fúndicas gástricas, se observan con menos frecuencia en ausencia de un tumor desmoide (115).
- Poliposis asociada al sistema de corrección de las polimerasas (PAAP): es una entidad asociada a variantes patogénicas en línea germinal localizadas en los dominios exonucleasa de las DNA polimerasas épsilon (POL $\epsilon$ ) y delta (POL $\delta$ 1). La mayoría de los pacientes tienen AFAP, con pocos pólipos, pero una minoría de casos tiene un fenotipo similar a LS (116). La mayoría de los heterocigotos de la variante POL $\epsilon$  desarrollan poliposis y CCR con una mediana de edad de 36 años, mientras que para la variante POL $\delta$ 1 la mediana es de 44 años. El segundo tumor en frecuencia para esta población son los carcinomas duodenales (117). En las mujeres heterocigotas para

POLδ1, predominan los carcinomas endometriales y ováricos antes de los 50 años (101).

- Síndrome de poliposis serrada (SPS): se caracteriza por el desarrollo de múltiples pólipos serrados por todo el colon confiriendo un mayor riesgo de CCR. Los criterios diagnósticos actualizados por la OMS en 2019 (90) son:

- 1) Cinco o más lesiones aserradas/pólipos proximales al recto, todas de tamaño  $\geq 5$  mm, siendo 2 o más lesiones  $\geq 10$  mm de tamaño
- 2) Más de 20 lesiones aserradas/pólipos de cualquier tamaño distribuidas por todo el colon, siendo 5 o más lesiones proximales al recto

Existe una mayor frecuencia de mutaciones en BRAF en la progresión de los pólipos hiperplásicos a los adenomas serrados. Los pólipos serrados pueden generar CCR estables (MSS) o inestables (MSI) a través de la adquisición del fenotipo metilador (CIMP) y la metilación del promotor MLH1 (118). También se han identificado mutaciones de la línea germinal en el gen supresor de tumores RNF43, una ubiquitina-proteína ligasa E3 que actúa como un regulador negativo de la señalización de WNT, y aunque su frecuencia es muy baja se considera una variantes genética causante (101).

- Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ): es un síndrome hereditario infrecuente, de herencia autosómica dominante, que se produce por una mutación en línea germinal en los genes de la serina/treonina cinasa 11 o de la cinasa hepática B1 (STK11/LKB1). El SPJ se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos hamartomatosos en todo el tracto gastrointestinal y máculas pigmentadas mucocutáneas sin transformación maligna (119), así como un mayor riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer (gastrointestinal, páncreas, pulmón, mama, útero, ovario y testículo). El CCR es el tumor más frecuente (39%), seguido del cáncer de mama en mujeres (32-54%) (101). Las personas con SPJ pueden sufrir cuadros de obstrucción intestinal debido a intususcepciones de pólipos hamartomatosos, y hemorragia digestiva por sangrado de los mismos, lo que puede derivar en una cirugía de urgencia (97).

- Síndrome de poliposis juvenil (JPS): es una entidad premaligna de herencia autosómico dominante y penetrancia incompleta caracterizada por la presencia de múltiples hamartomas gástricos y/o colónicos. Las variantes patogénicas de línea germinal en BMPR1A y SMAD4 se identifican en entre el 50 y el 70% de los individuos afectados (97). El JPS está asociado con un mayor riesgo de cáncer gástrico y colorrectal a partir de los 20 años, que puede llegar a alcanzar el 68% a los 60 años (120). Las personas con mutaciones en SMAD4 tienen riesgo de desarrollar telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT).
- Síndrome PTEN-hamartoma (PHTS): se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama, tiroides, endometrio y riñón como resultado de variantes patogénicas en línea germinal en PTEN. PTEN contribuye a la apoptosis y al ciclo celular mediante la regulación de la vía PI3K/AKT/mTOR. Bajo esta denominación (PHTS) se incluyen los síndromes de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS), Cowden (CS), Gorlin (GS) y Proteus-like con diferentes fenotipos clínicos en función de la variante patogénica (97). El riesgo acumulado de cáncer (de cualquier tipo) a lo largo de la vida de estos pacientes oscila entre el 81%-90%, con una mediana de edad al diagnóstico de 36 años (121). El fenotipo gastrointestinal del PHTS incluye hamartomas gástricos y colorrectales, adenomas, pólipos serrados, pólipos hiperplásicos, lipomas y ganglioneuromas (101). No hay evidencia de que los pacientes afectados del PHTS tengan mayor riesgo que la población general de desarrollar un CCR, pero sí hay evidencia de una edad más temprana al diagnóstico (46 a 58 años frente a los 73 años de la población general) y de un mayor riesgo (6 veces más) de desarrollar CCR como segundo primario (121).
- Síndrome de poliposis mixta hereditaria (HMPS): se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos colorrectales con una mezcla de fenotipos incluyendo lesiones serradas, adenomas y hamartomas, y se asocia con un mayor riesgo de CCR. Aún no se han establecido criterios diagnósticos para el HMPS (101). La causa genética no ha podido determinarse, si bien se han identificado variantes patogénicas en línea germinal en GREM1 (122) y en BMPR1A (123).

#### **1.4.1.2 Historia personal y familiar**

Los antecedentes personales y familiares de pólipos adenomatosos o de CCR, independientemente de los síndromes genéticos de predisposición hereditaria, también constituyen un factor de riesgo para desarrollar un CCR:

- Un antecedente personal de pólipos adenomatosos, vellosos, túbulo-vellosos o superiores a 1 cm, con alto grado de displasia aumenta entre 3,6 y 6,6 veces el riesgo relativo de desarrollar un CCR (124).
- Un antecedente familiar de primer grado (padres, hijos y hermanos) presenta un RR de 2,04 de riesgo de desarrollar un CCR en mayores de 60 años en comparación con la población general, y aumenta progresivamente a medida que se identifican más antecedentes de primer o segundo grado (125).

#### **1.4.1.3 Edad**

En los países desarrollados, la incidencia de CCR en personas menores de 50 años ha ido en aumento creciente en las últimas décadas para ambos sexos. Hoy en día, este CCR de aparición temprana se considera una entidad diferenciada dentro del CCR, ya que además presentan características clínicas y moleculares diferentes con los CCR en edades más avanzadas de la vida. Aunque se desconocen las causas, se cree que el estilo de vida occidental, la obesidad y el uso de antibióticos pueden provocar alteraciones genéticas y epigenéticas que pueden alterar la microbiota intestinal y deprimir el sistema inmunitario (126), contribuyendo así al proceso de carcinogénesis.

#### **1.4.1.4 Enfermedad inflamatoria intestinal**

La colitis ulcerosa aumenta 2,4 veces la ratio de incidencia de desarrollar un CCR, sobre todo en varones jóvenes al diagnóstico y con pancolitis (127). Si bien la pancolitis incrementa el riesgo hasta 15 veces más (128), la afectación exclusiva de colon izquierdo lo multiplica por tres mientras que en pacientes con proctitis o proctosigmoiditis exclusiva no parece existir un incremento significativo del riesgo (129). La evidencia del aumento de riesgo de CCR en enfermedad de Crohn es menos consistente. De hecho, no parece haber un incremento en el cáncer de recto (130).

#### **1.4.1.5 Factores de riesgo cardiovascular**

- **Tabaco**

El tabaco incrementa el riesgo de desarrollar todo tipo de pólipos colorrectales, tanto adenomatosos (131) como serrados de predominio en el lado izquierdo (132). En pacientes con síndrome de Lynch, el tabaco incrementa el riesgo de desarrollar adenomas y CCR (133,134). Además, incrementa la incidencia de CCR en los fumadores frente a los no fumadores (RR: 1,20), sobre todo en varones frente a las mujeres (RR: 1,35) y en los tumores de recto frente a los de colon (RR: 1,36) (135). También incrementa la mortalidad por CCR (RR: 1,25) con una asociación más fuerte para el cáncer de recto frente al de colon (133).

- **Alcohol**

El consumo elevado de alcohol aumenta el riesgo de CCR, aunque en mayor medida el de cáncer de recto (RR: 1,63) frente al de colon (RR: 1,25) (136) con una relación dosis dependiente y con un mayor efecto de la cerveza (RR: 1,38) frente al vino (RR: 1,21) sin alcanzar diferencias significativas entre ambas bebidas (137).

- **Obesidad**

Varios estudios y meta-análisis (138,139) han demostrado que el sobrepeso y la obesidad, definida como un índice de masa corporal (IMC) superior a 25Kg/m<sup>2</sup>, son responsables de hasta el 11% de los casos de CCR (140). Aunque la mayoría de estudios han utilizado el IMC para definir el riesgo relativo de CCR, el perímetro abdominal o el índice cintura/cadera son más sensibles (55).

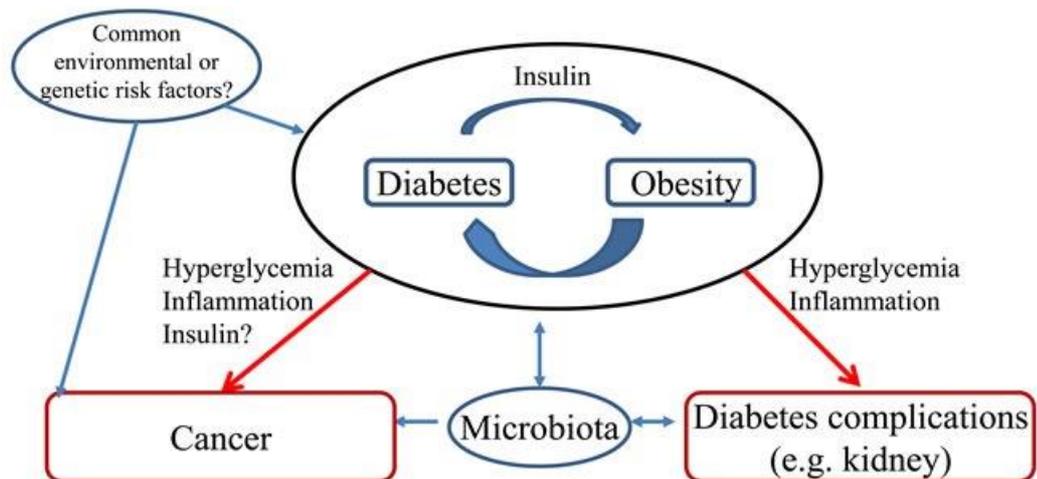
Este aumento de riesgo se ha visto fundamentalmente en hombres y tanto para el cáncer de colon, el cáncer de recto, y los adenomas colorrectales. La tendencia para las mujeres y los adenomas parece menos consistente. Además, la obesidad parece ser un factor de mal pronóstico que se relaciona con la resistencia a antiangiogénicos, la recurrencia del cáncer o la mortalidad (138).

Los mecanismos subyacentes a este aumento de riesgo incluyen el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina, la inflamación crónica, las alteraciones en los niveles de las adipocitoquinas y las hormonas sexuales, así como los cambios en la microbiota intestinal (138,141).

- Diabetes y resistencia a la insulina

La diabetes mellitus (DM), sobre todo la DM tipo 2, se asocia con un elevado riesgo de padecer distintos tipos de cáncer; entre ellos el CCR (142). Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado esta asociación (139,143–145). Sin embargo, otros estudios han detectados sesgos de selección y/o de causalidad inversa (falacia *cum hoc ergo propter hoc*) al inferir una relación causal entre dos eventos correlacionados, ya que el CCR y la DM-2 comparten varios factores de riesgo (obesidad, inflamación, dietas hiperproteicas y pobres en fibra, alteraciones en la microbiota, hipomagnesemia, edad...) que podrían actuar como factores de confusión (146).

Algunos autores han planteado que podría existir una relación causal entre obesidad, resistencia a la insulina, diabetes y CCR (146) (Figura 36).



**Figura 36. Relación entre diabetes y CCR. Hipótesis causales. Tomado de (146)**

También se ha descrito el papel pronóstico adverso de la DM asociando (frente a los pacientes no diabéticos) un mayor riesgo de mortalidad específica por cáncer y por enfermedad cardiovascular, así como una peor supervivencia libre de enfermedad (147,148).

- Consumo de carne roja y procesada

La asociación entre el consumo de carne roja y procesada con un mayor riesgo de CCR no está completamente demostrada, aunque algunos estudios parecen sugerirlo, con un mayor efecto para los tumores de recto (149–151).

Como hipótesis etiopatogénicas, se ha señalado el papel del proceso de cocinado a elevadas temperaturas (barbacoa o frituras), tanto por la producción de hidrocarburos poliaromáticos a partir de las proteínas durante el proceso de carbonización, como por la producción de radicales libres y nitrosaminas (debido al elevado contenido en hierro de la carne roja) cuyo potencial carcinogénico ha sido demostrado (151,152).

#### **1.4.1.6 Otros factores**

- Raza y sexo: la raza negra tiene tasas de incidencia y mortalidad superiores a la caucásica junto con un desarrollo a edad más temprana (153). Algunos estudios han indicado que existen diferencias asociadas al sexo en el desarrollo del CCR, entre las que se mencionan una mayor frecuencia de CCR en el lado derecho para las mujeres y una mayor incidencia y mortalidad en las mujeres mayores de 65-70 años (154).
- Radioterapia pélvica: incrementa el riesgo de cáncer de recto en pacientes tratados por cáncer de próstata y endometrio (155), así como cáncer colorrectal en población pediátrica tratados con radioterapia con un riesgo incremental en función del volumen y dosis de la radiación (156).
- Fibrosis quística: el riesgo de desarrollar un cáncer gastrointestinal (entre ellos el CCR) es mayor en los enfermos de fibrosis quística que aumenta en aquellos sometidos a un trasplante pulmonar (157)
- Acromegalia: los pacientes con acromegalia presentan mayor riesgo de desarrollar pólipos colorrectales en la región rectosigmoidea (158) y de CCR (159). La causa subyacente parece relacionarse con los niveles elevados de la hormona GH y del *Insulin Growth Factor* (IGF-1).
- Trasplante renal: como consecuencia de la inmunosupresión asociada al trasplante, se ha descrito una mayor incidencia de CCR (160) de características similares al CCR esporádico de la población general (161) sin diferencias en supervivencia salvo en casos avanzados (162).

- Terapia de deprivación androgénica (ADT): los estudios en pacientes con cáncer de próstata tratados con ADT aportan resultados contradictorios, pero coinciden en que los pacientes sometidos a orquiectomía presentan un mayor riesgo que la población general en desarrollar un CCR, probablemente en relación con una exposición a la ADT más prolongada (163,164).

#### **1.4.2 Factores protectores**

- Actividad física

El estilo de vida sedentario se asocia con numerosas enfermedades y a pesar de que el ejercicio se asocia con una reducción en la incidencia de estas, la magnitud de este beneficio es difícil de cuantificar, ya que probablemente la actividad física sea más frecuente e intensa en personas que además llevan estilos de vida saludables. En general, una mayor actividad física parece conferir una reducción en el riesgo de padecer un CCR (165). Sin embargo, parece que el beneficio se limita a los tumores de colon y no a los rectales (166,167).

- Ácido acetilsalicílico (AAS) y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Numerosos estudios han demostrado que el uso regular y continuado de AAS y otros AINEs disminuye la incidencia de pólipos adenomatosos y CCR (168,169). Los estudios más consistentes han demostrado que el beneficio de la AAS se objetiva a partir de tomarla durante al menos cinco años y sólo es significativo a partir de los 10 años de tratamiento (170,171). Según estos estudios, la reducción del riesgo parece ser más marcada para los CCR proximales. La dosis mínima necesaria no ha sido bien definida todavía.

El beneficio de la AAS también se ha demostrado en pacientes con síndrome de Lynch, donde con una dosis de 600 mg/día y a 10 años de seguimiento, ha demostrado disminuir el riesgo de desarrollar un CCR (172).

A pesar de la evidencia acumulada, no hay un consenso sobre las indicaciones del tratamiento con AAS y AINEs en prevención primaria o secundaria del CCR. No hay datos que justifiquen su uso como una indicación estándar para todos los pacientes, y se admite que probablemente solo algunos subgrupos de pacientes se benefician de la misma.

- Factores dietéticos

Mientras que algunos estudios epidemiológicos han sugerido que una dieta rica en frutas y verduras se asocia con una disminución del riesgo relativo de desarrollar un CCR (173,174), sobre todo en el CR (175), otros estudios no han evidenciado esta asociación. Por tanto la evidencia no es unánime. Esto se explica por la multitud de factores que influyen en la génesis del CCR y que no pueden ser controlados en los estudios observacionales.

- Fibra

La ingesta de fibra también ha sido considerada como un factor protector para el desarrollo del CCR basándonos en la idea de que la fibra acelera el tránsito intestinal, disminuye el estreñimiento y, por ende, el tiempo de exposición a los carcinógenos ingeridos en la mucosa intestinal.

Aunque varios estudios sugieren un efecto potencialmente beneficioso de la ingesta de fibra, los resultados de los estudios epidemiológicos y meta-análisis son discordantes (176,177). Se necesitan estudios prospectivos a largo plazo para definir su papel con detalle.

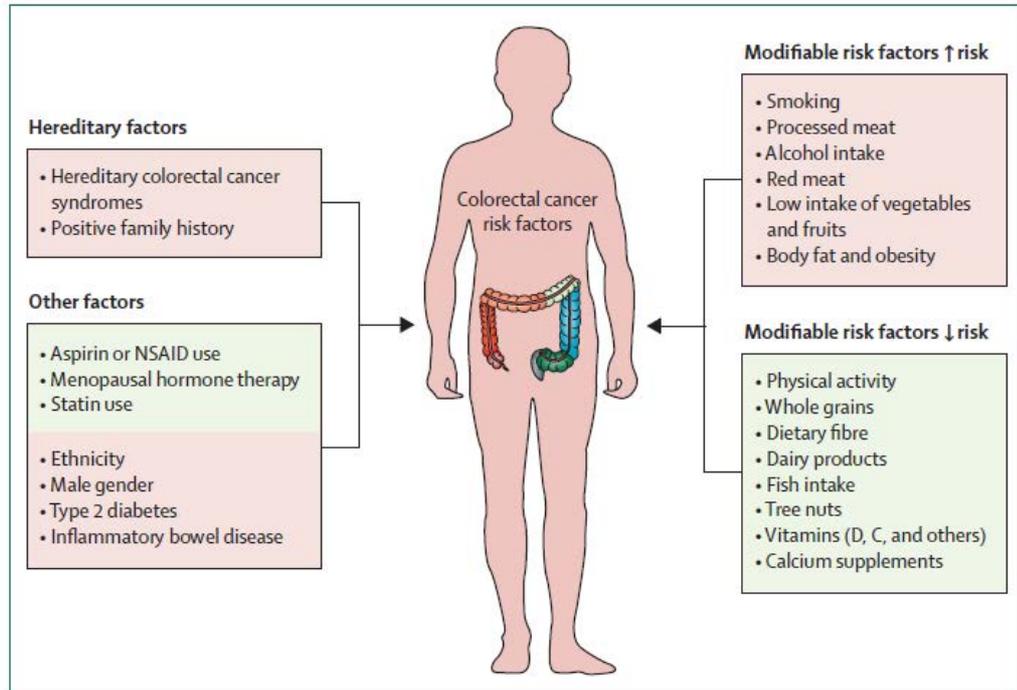
- Calcio y productos lácteos

El papel de suplementación con calcio y lácteos en la prevención de los adenomas colorrectales y el CCR ha sido evaluado en numerosos estudios con resultados positivos en la prevención secundaria de pólipos adenomatosos (178,179), de tal manera que el colegio americano de gastroenterólogos lo ha recomendado para esta indicación (180).

A pesar de estos resultados, en el caso del CCR los resultados son contradictorios y no se puede afirmar que la suplementación con calcio disminuye el riesgo de CCR. Los estudios positivos parecen encontrar una disminución significativa, pero modesta, de la incidencia para la leche restringida principalmente al CCR proximal, pero no en el cáncer de recto (181,182). El papel de los lácteos es controvertido, ya que las grasas de algunos productos podrían contrarrestar el efecto positivo del calcio.

○ Vitamina D

Los niveles bajos de vitamina D se han relacionado con varios tipos de cáncer, entre ellos el CCR (183,184). Sin embargo, la suplementación con vitamina D no ha demostrado reducir la incidencia de CCR (185) (Figura 37).



**Figura 37. Factores de riesgo del cáncer colorrectal. Tomado de (186)**

Otros factores con una evidencia limitada y/o resultados contradictorios sobre su papel protector en la incidencia de CCR se exponen en la Tabla 10.

<b>Tabla 10. Otros factores con evidencia contradictoria</b>		
Suplementación con ácido fólico y folatos.	Ingesta de vitamina B6.	Ingesta de ajo.
Ingesta de Magnesio.	Consumo de pescado.	Ingesta de café.

## **1.5 Presentación clínica del cáncer de recto**

La mayoría de los CCR en fases precoces se diagnostican en fases asintomáticas gracias a las pruebas de cribado. Sin embargo, el cáncer de recto, por su localización, puede presentar además signos y síntomas derivados del crecimiento local del tumor.

La historia clínica y el examen físico nos permitirán obtener la información que nos debe hacer sospechar el diagnóstico. Los síntomas más frecuentes suelen ser (187):

- Cambios en el hábito intestinal (74%). Alternancia diarrea/estreñimiento.
- Rectorragia (71%).
- Sensación de masa rectal (24,5%). Tenesmo.
- Anemia por pérdidas microscópicas (9,6%).
- Dolor y/o distensión abdominal (3,8%).

Las complicaciones agudas del cáncer de recto son relativamente poco frecuentes, pero entre ellas destacan la obstrucción o perforación intestinal. En raras ocasiones, pueden producirse hemorragias masivas o fístulas (recto-vesicales o recto-vaginales).

## **1.6 Diagnóstico y estadificación del cáncer de recto**

### **1.6.1 Diagnóstico precoz**

Los programas de cribado o diagnóstico precoz para la población general tienen como objetivo identificar a las personas afectadas por lesiones tumorales o pre-tumorales en ausencia de sintomatología con el objetivo de disminuir la incidencia y reducir la mortalidad. Las personas con criterios de alto riesgo o síndromes de cáncer familiar o hereditario no entrarían en este programa ya que su seguimiento se realiza de acuerdo a protocolos específicos.

En España, el programa de cribado de CCR se incorporó a la cartera común de servicios del Sistema Nacional de Salud en 2014 (Orden SSI/2065/2014) (188) y se basa en la prueba de sangre oculta en heces realizada cada dos años en toda la población comprendida entre 50 y 69 años. No obstante, existe gran variabilidad en las recomendaciones y los rangos de edad entre las autonomías. La positividad de este test obliga a la realización de una endoscopia que permita descartar la existencia de un CCR subyacente.

## **1.6.2 Pruebas complementarias**

### **1.6.2.1 Marcadores tumorales**

Se entiende por marcadores tumorales las determinaciones de los niveles de ciertas proteínas en la sangre. El más utilizado en CCR es el antígeno carcinoembrionario (CEA), aunque tiene muy poca capacidad diagnóstica, ya que puede elevarse en fumadores (189) y en otras etiologías no malignas, como la úlcera gástrica, la EPOC, la diabetes o los procesos inflamatorios crónicos. Por este motivo, ni el CEA ni ningún otro marcador deben usarse como prueba de detección o diagnóstico del CCR.

Lo que sí se ha demostrado es que los niveles elevados de CEA al diagnóstico son un factor de mal pronóstico y un potencial marcador de persistencia de enfermedad residual cuando estos niveles no se normalizan tras la cirugía (190).

### **1.6.2.2 Endoscopia**

#### **1.6.2.2.1 Colonoscopia**

La colonoscopia es la prueba de elección para el diagnóstico, ya que permite visualizar y biopsiar lesiones sospechosas a lo largo de todo el intestino grueso, descartar la presencia de neoplasias sincrónicas y extirpar todos los pólipos sospechosos.

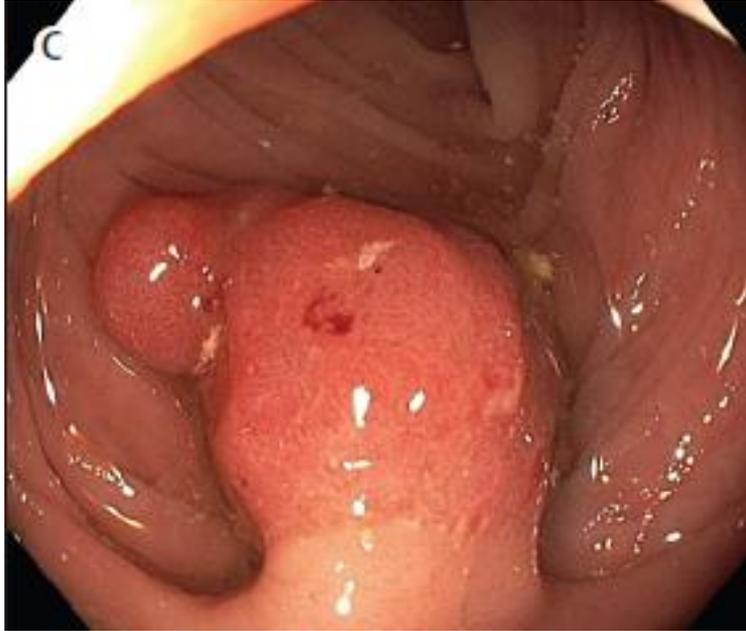
La mayoría de los CCR se visualizan como lesiones endoluminales que emergen desde la pared de la mucosa hacia la luz del colon (Figura 38). Morfológicamente, las lesiones pueden ser de diferentes tipos y presentar signos de necrosis o ulceración. Cualquier lesión sospechosa debe ser biopsiada o extirpada endoscópicamente. En presencia de una lesión obstructiva que impida el paso del endoscopio, debe repetirse una colonoscopia completa hasta el ciego tras la cirugía para descartar la presencia de otras lesiones sincrónicas.

#### **1.6.2.2.2 Rectosigmoidoscopia**

No se considera una prueba de elección por no evaluar por completo la totalidad del colon. Sin embargo, esta técnica permite el diagnóstico de tumores de recto, aunque sin excluir la necesidad de completar posteriormente una colonoscopia completa.

### **1.6.2.3 Biopsia**

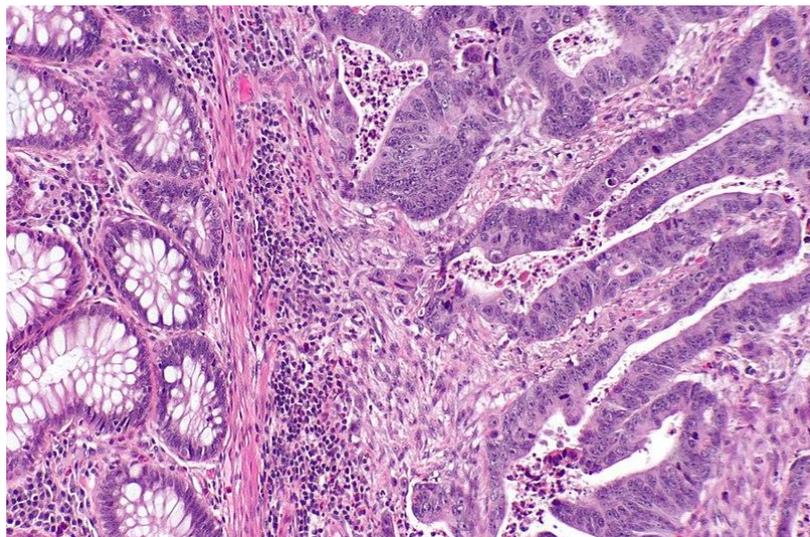
El diagnóstico definitivo de un cáncer de recto se determina gracias al estudio histopatológico de la biopsia endoscópica o quirúrgica de una lesión sospechosa. La gran mayoría de los tumores de recto son carcinomas, siendo el 90% adenocarcinomas.



**Figura 38. Imagen endoscópica de un cáncer colorrectal .Tomado de (186)**

Los adenocarcinomas se caracterizan por la formación glandular, base de su clasificación histológica (Figura 39) en bien diferenciado (G1: >95% del tumor forma glándulas), moderadamente diferenciado (G2: 50-95% forma glándulas) y pobremente diferenciado (G3: sólido y <50% forma glándulas).

En la práctica, la mayoría de los adenocarcinomas colorrectales (~70%) se diagnostican como moderadamente diferenciados. Los carcinomas bien y pobremente diferenciados representan el 10% y el 20%, respectivamente (191) .



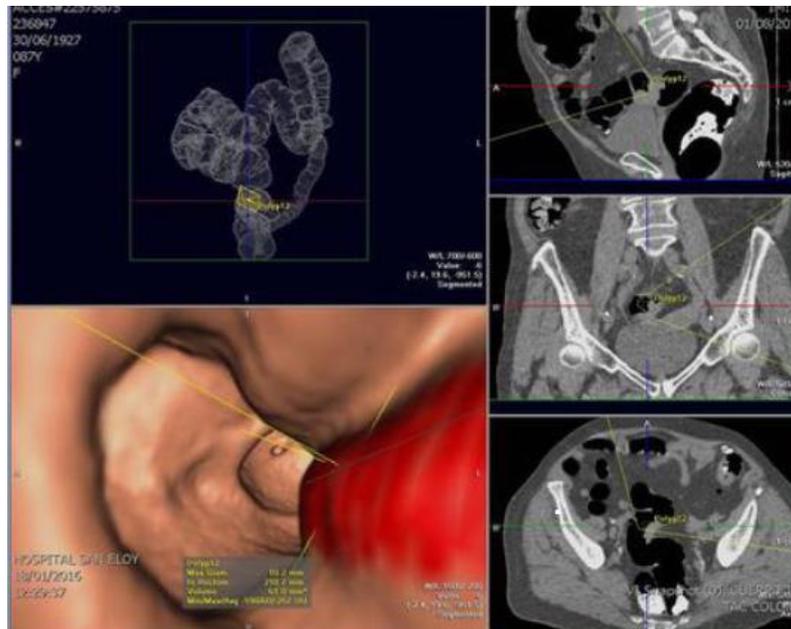
**Figura 39. Corte histológico de un adenocarcinoma colorrectal. Tomado de (192)**

#### **1.6.2.4 Exploraciones radiológicas**

El CCR puede sospecharse a partir de uno o más de los síntomas y signos descritos anteriormente o puede ser asintomático y descubierto mediante la detección de rutina de sujetos de riesgo medio y alto. Una vez que se sospecha de CCR, la siguiente prueba debe ser la colonoscopia o la colonografía por TC.

##### **1.6.2.4.1 Colonoscopia virtual**

También se denomina colonografía guiada por TAC o colono-TAC. Se trata de una prueba de imagen complementaria que mediante la técnica del TAC y un complejo software permite visualizar la luz del colon. Las imágenes pueden analizarse en dos (2D) o tres (3D) dimensiones. Ambas imágenes son complementarias y ayudan a una mejor interpretación y precisión diagnóstica (Figura 40).



**Figura 40. Ejemplo de un engrosamiento excéntrico de la pared del sigma producido por un adenocarcinoma. Tomado de (193).**

Las indicaciones más aceptadas para realizar una colono-TC son (193):

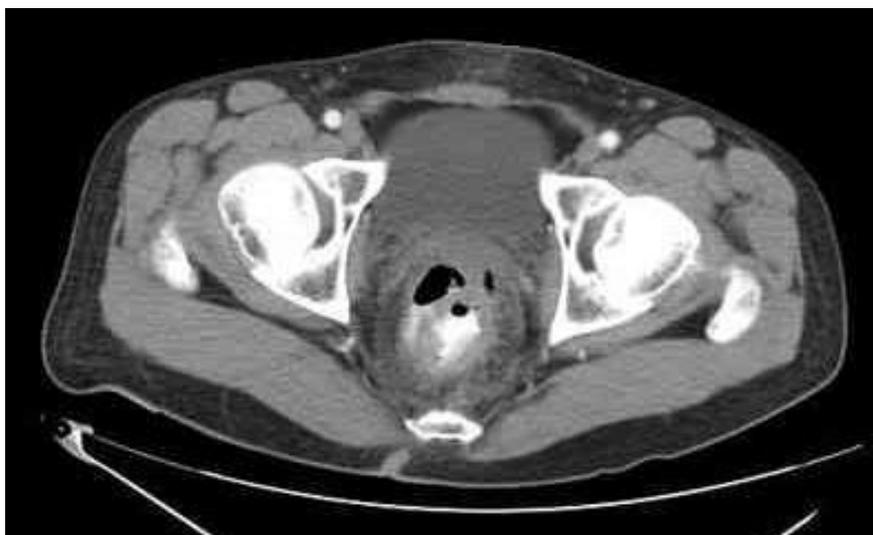
- 1) Colonoscopia incompleta al diagnóstico.
- 2) Contraindicaciones o negativa para realizarse la colonoscopia.
- 3) Pacientes sintomáticos de edad avanzada.
- 4) Caracterización de lesiones detectadas en la colonoscopia.
- 5) Necesidad de mapeo del colon previo a una cirugía.
- 6) Seguimiento de pacientes con CCR intervenido.

La colono-TC es una alternativa igualmente sensible y menos invasiva a la colonoscopia, pero el estándar sigue siendo la colonoscopia ya que en el mismo acto permite la toma de biopsias y la extirpación de cualquier lesión sospechosa.

#### **1.6.2.4.2 Tomografía Axial Computarizada (TAC)**

En los estadios II, III y IV del CCR (ver 6.3 Estadificación) es imprescindible realizar un TAC como estudio de extensión, previamente a la cirugía, ya sea para valorar complicaciones locales del tumor (obstrucción, perforación o fístula) y/o determinar la existencia de diseminación tumoral a nivel pélvico o en cualquier órgano sólido de tórax y abdomen (Figura 41).

La importancia del TAC de tórax de extensión, en el cáncer de recto, radica en que las venas rectales inferiores, que irrigan el tercio inferior del recto, drenan a la vena cava inferior a través de las venas ilíacas internas, evitando el primer paso hepático y pudiendo presentar metástasis pulmonares sin afectación hepática. Sin embargo, el TAC no es la herramienta ideal ni para evaluar la extensión local del tumor primario ni la afectación peritoneal.

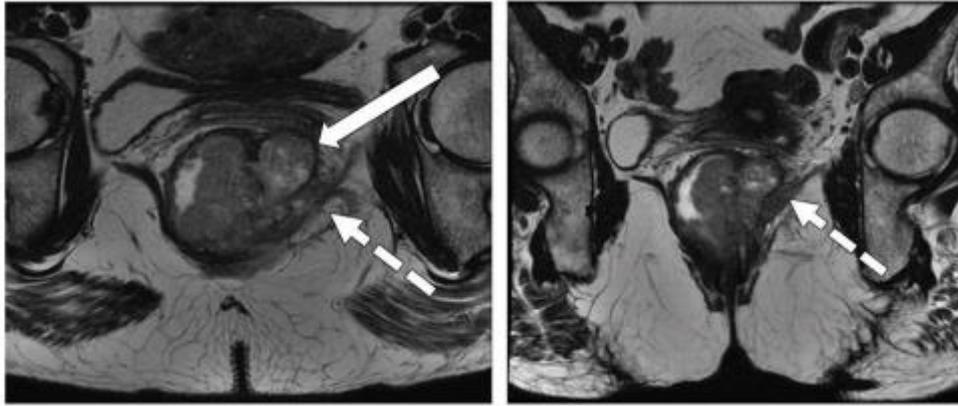


*Figura 41. TAC abdomino-pélvico que muestra un tumor rectal. Tomado de (194)*

#### **1.6.2.4.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Es la prueba de elección para valorar la extensión local de los tumores de recto. La RMN permite valorar mejor los tejidos blandos respecto a otras pruebas de imagen, pudiendo diferenciar el tejido tumoral de los tejidos propios y así poder definir el grosor de la infiltración tumoral en la pared rectal y la afectación o no de órganos vecinos. En la estadificación del cáncer de recto, la RMN nos proporciona (195) (Figuras 41 y 42):

- a) Localización y morfología del tumor.
- b) Establece las categorías T y N de la clasificación AJCC.
- c) Detecta la presencia de invasión vascular extramural (EMVI).
- d) Identifica la afectación del complejo esfinteriano y de la fascia mesorrectal.



**Figura 41. Cortes axiales y coronales que muestran un tumor rectal (flecha continua) que infiltra más allá de la capa muscular propia invadiendo el esfínter externo y el músculo elevador del ano (flecha discontinua). Tomado de (195)**



**Figura 42. De izquierda a derecha: CR (flechas) alto, medio y bajo. Tomado de (195)**

Esta información nos permite distinguir los tumores de recto localizados de los localmente avanzados, lo que tiene implicaciones tanto pronósticas como terapéuticas. En los últimos años, se ha desarrollado una subclasificación del estadio T3 en 4 categorías basada en la información proporcionada por la RMN (Ver 6.3. Estadificación). La RMN es esencial para evaluar la respuesta al tratamiento neoadyuvante, contribuyendo a la toma de decisiones terapéuticas en casos de respuesta completa (Ver 7.1.9. Estrategia "Watch and wait").

#### 1.6.2.4.4 Ecografía endoscópica transrectal (ECOendoscopia)

La ECOendoscopia ha quedado desplazada por la RMN para la estadificación de los estadios II y III, y su uso está limitado a situaciones de contraindicación para realizar una RMN o en tumores de mucosa y submucosa (Estadios T1-T2 N0) (196).

#### 1.6.2.4.5 Tomografía por emisión de positrones (PET)

No ha demostrado añadir información complementaria al TAC, por lo que no se recomienda su realización de manera rutinaria en la estadificación prequirúrgica.

### 1.6.3 Estadificación

#### 1.6.3.1 Estadificación pre-quirúrgica (cTNM)

El sistema estándar de estadificación del cáncer de recto es el que aparece recogido en la octava versión del sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (197,198). La versión vigente data de 2017 y cuando hace referencia al estadio prequirúrgico se acompaña del prefijo c (clínica) (Tablas 11 y 12).

<b>Tabla 11. Sistema de estadificación de la UICC TNM (8ª edición). Adaptado de (196,197)</b>			
<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2		
IIA	T3		
IIB	T4a		
IIC	T4b		
IIIA	T1-T2		
	T1	N2a	
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	
	T2-T3	N2a	
	T1-T2	N2b	
IIIC	T4a	N2a	
	T3-T4a	N2b	
	T4b	N1-N2	
IVA	Any T	Any N	M1a
IVB			M1b
IVC			M1c

**Tabla 12. Sistema de estadificación de la UICC TNM (8ª edición).**  
**Adaptado de (196,197)**

<b>T- Tumor primario</b>		<b>N – Ganglios linfáticos regionales</b>	
<b>TX</b>	No valorable	<b>NX</b>	No valorables
<b>T0</b>	Sin evidencia de tumor primario	<b>N0</b>	Sin ganglios metastásicos
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: invade lámina propia	<b>N1</b>	Metástasis en 1-3 ganglios
<b>T1</b>	Invade la submucosa	<b>N1a</b>	Metástasis en 1 ganglio
<b>T2</b>	Invade <i>muscularis</i> propia	<b>N1b</b>	Metástasis en 2-3 ganglios
<b>T3</b>	Invade subserosa o tejidos perirrectales no peritoneales	<b>N1c</b>	Depósitos tumorales en subserosa o tejidos perirrectales no peritoneales sin metástasis en ganglios.
<b>T4</b>	Invade otros órganos o estructuras y/o perfora peritoneo visceral	<b>N2</b>	Metástasis en 4 o más ganglios
<b>T4a</b>	Perfora peritoneo visceral	<b>N2a</b>	Metástasis en 4-6 ganglios
<b>T4b</b>	Invade otros órganos o estructuras	<b>N2b</b>	Metástasis en 7 o más ganglios
<b>M - Metástasis a distancia</b>			
<b>M0</b>	Sin metástasis a distancia		
<b>M1</b>	Metástasis a distancia		
<b>M1a</b>	Metástasis limitadas a un órgano sin metástasis peritoneales		
<b>M1b</b>	Metástasis en más de un órgano		
<b>M1c</b>	Metástasis en peritoneo con o sin afectación de órganos		

Las guías ESMO (196) reconocen la utilidad clínica de la subclasificación de la categoría T3 basada en la RMN, aunque no está validada ni incorporada al sistema TNM (Figura 44) (Tabla 13).

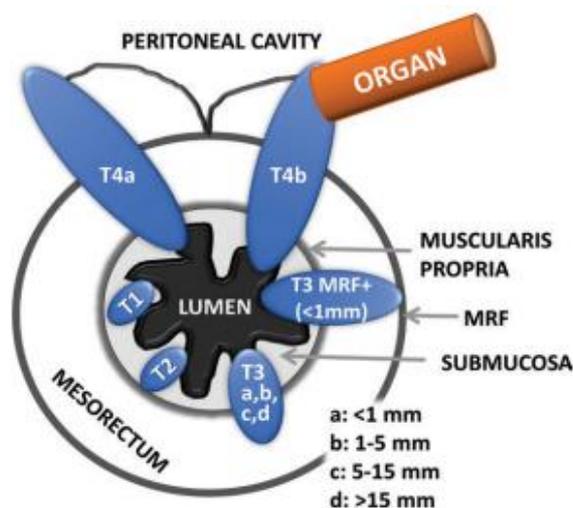


Figura 44. Extensión local de la categoría T. Tomado de (191)

<b>Tabla 13. Categoría T3 y subcategorías. Adaptado de (192)</b>	
<b>T3 - Invade subserosa o tejidos perirrectales no peritoneales</b>	
<b>T3a</b>	<1mm
<b>T3b</b>	1-5mm
<b>T3c</b>	5-15mm
<b>T3d</b>	>15mm

### 1.6.3.2 Estadificación post-quirúrgica (ypTNM)

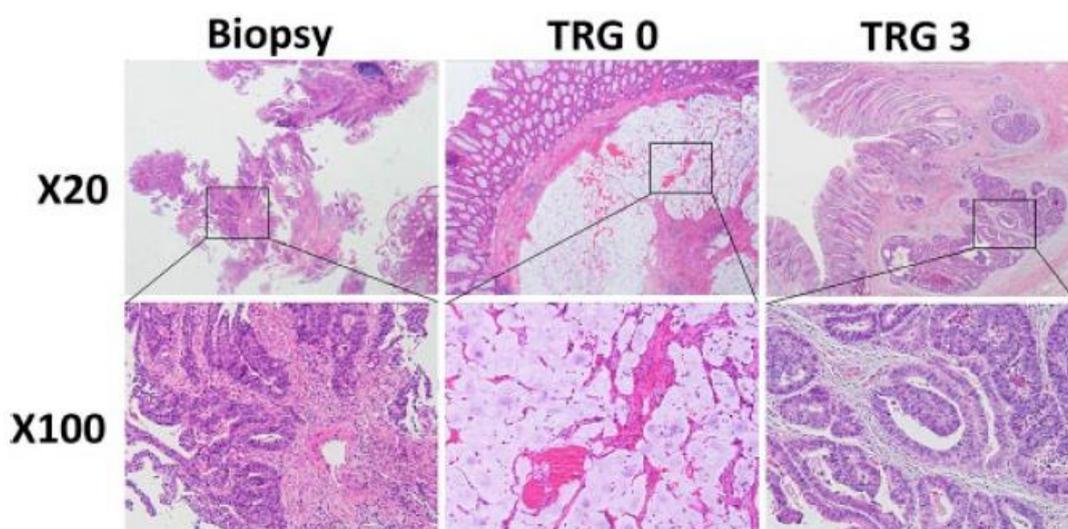
Los tumores de recto tratados con quimioterapia y/o radioterapia neoadyuvante y posterior cirugía deben clasificarse de nuevo según el sistema TNM, aunque en esta ocasión la categoría incluirá dos nuevos prefijos: y (neoadyuvancia) y p (patológico).

Alrededor del 60% de los pacientes tratados con neoadyuvancia alcanzará cierto grado de respuesta patológica, con un porcentaje variable de respuestas patológicas completas (pCR) que oscila entre el 10-20% (199,200). Este grado de regresión tumoral (GRT) se ha considerado un marcador subrogado de supervivencia independientemente

de los parámetros clínico-patológicos (201,202). Sin embargo, el elevado número de sistemas de gradación de respuesta (197,203–207) dificulta su uso en la práctica clínica.

Entre todos estos sistemas, la AJCC y el Colegio Americano de Patólogos (CAP) recomiendan una puntuación de regresión tumoral de cuatro puntos basada en la clasificación de Ryan modificada (197,205,207) (Tabla 14) (Figura 45). Este sistema ha sido validado de manera independiente (208).

<b>Tabla 14. Sistema modificado de Ryan para clasificar la regresión tumoral. Adaptado de (207)</b>		
<b>Descripción</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Score</b>
Sin células tumorales viables	Completa	0
Células tumorales sueltas o pequeños grupos aislados infrecuentes	Casi completa	1
Tumor residual con regression evidente pero mayor que células tumorales sueltas o grupos aislados infrecuentes	Parcial	2
Extenso tumor residual sin evidencia de regresion tumoral	Pobre o sin respuesta	3



**Figura 45. Grados de regresión tumoral adenocarcinoma de recto tratado con neoadyuvancia. Tomado de (209)**

## **1.7 Tratamiento del cáncer de recto.**

### **1.7.1 Tratamiento quirúrgico. Recuerdo histórico y tratamiento actual.**

*John de Arden* (1307-1392), cirujano inglés del siglo XIV y considerado el padre de la coloproctología, fue el primero en describir los signos y síntomas del cáncer de recto (al que denomina "Bubo"). *Arden* realizó el diagnóstico diferencial con otras entidades, como la disentería, atendiendo a las características de los productos patológicos de las deposiciones y constató el mal pronóstico de esta enfermedad (210). A pesar del temprano conocimiento, la extirpación total del CR no se realizó hasta el siglo XIX (211).

#### **1.7.1.1 Estomas**

La cirugía del CR es inseparable de los estomas. Aunque la primera colostomía inguinal izquierda se atribuye al cirujano francés Duret en 1793 como tratamiento de un ano imperforado. Uno de los pioneros en utilizar los estomas en los casos fue el cirujano inglés Daniel Pring (1789-1859), quien en 1820 realiza una colostomía de descarga en fosa ilíaca izquierda a una mujer de 64 años debido a un cuadro obstructivo secundario a un cáncer de recto-sigma estenosante (212). Posteriormente, Jean Zulema Amussat (1796-1856) publicó en 1835 un caso similar en una mujer de 48 años en la que realizó un estoma en la región lumbar sin entrar en la cavidad peritoneal. Esta nueva técnica quirúrgica que llevará su nombre, llamada colostomía lumbar extraperitoneal, se concibe como una alternativa para evitar la peritonitis en una época anterior a la antisepsia, donde la tasa de complicaciones y la mortalidad por peritonitis tras una laparotomía era muy elevada (213).

#### **1.7.1.2 Abordaje perineal**

Se atribuye a Jean Faget la primera resección rectal perineal en 1793, como tratamiento de un extenso absceso isquiorrectal que evidenció la presencia de un cáncer rectal perforado (214). La primera cirugía exitosa de cáncer de recto fue realizada por Jacques Lisfranc (1787-1847) en 1826 en el *Hôpital de la Pitié* de París a un hombre de 45 años llamado Joseph Poulain, afecto de un tumor de tercio medio-inferior que ocupaba más de la mitad de la circunferencia rectal, y al que mediante un abordaje perineal o posterior, se le extirpó la porción infraperitoneal y unos centímetros de recto inferior (215). Procedimientos similares se realizaron por toda Europa. Sirva como ejemplo en Inglaterra Humbert Mayo en 1833 y James Wardrop (1782-183) en 1834, así como en Alemania Johann Dieffenbach (1789-1847) en 1845 (216). Se dice que Theodor Billroth, el padre de la cirugía visceral, habría realizado esta cirugía hasta en una cincuentena de ocasiones entre 1860 y 1872 (217).

La característica fundamental de estas primeras cirugías es su carácter eminentemente paliativo, ya que se trataba de resecciones locales limitadas al canal anal y a la parte inferior del recto, que únicamente aportaban una paliación sintomática temporal, ya que, de acuerdo con la historia natural de la enfermedad, el tumor volvía a reaparecer sistemáticamente. Además, el riesgo de hemorragia e incontinencia fecal permanente hacía que muchos cirujanos cuestionaran y desaprobaban esta técnica, llegando incluso a ser desaconsejada en los manuales quirúrgicos de la época, por considerarse un procedimiento “bárbaro y sin evidencia científica” (218).

### **1.7.1.3 Abordaje posterior**

Tras el descubrimiento de la anestesia y las nuevas precauciones antisépticas, a finales del siglo XIX la resección del cáncer de recto fue de nuevo cobrando popularidad y se desarrollaron nuevas técnicas. Uno de los pioneros en el abordaje posterior del cáncer de recto fue Aristide Auguste Verneuil (1823-1895), que en 1873 amplió los límites del campo quirúrgico de la técnica de Lisfranc resecando el coxis. Esta técnica fue desarrollada también por Theodor Kocher (1841-1917), que entre 1873 y 1876 reseco parte del sacro y el coxis, y comenzó a realizar el cierre del ano mediante una sutura en “bolsa de tabaco” o “jareta” para evitar la contaminación fecal.

Otro de los grandes avances fue la popularización del abordaje trans-sacro gracias al cirujano alemán Paul Kraske (1851-1930), que presentó sus resultados en dos pacientes intervenidos con dicha técnica en el XIV Congreso de la Sociedad Alemana de Cirujanos en Berlín en 1885 (219). Con esta nueva variante del abordaje posterior, que incluía la resección del coxis y parte del sacro, se conseguía un mejor control de la hemorragia. Esta operación y las modificaciones menores de Hochenegg, Badenbauer, Levy y Rydygier fueron populares en el siglo XX.

### **1.7.1.4 Cirugía abdomino-perineal**

La primera resección abdomino-perineal por cáncer de recto fue realizada por un cirujano bohemio, Vincent Czerny (1842-1916) en 1883, cuando por necesidad, al no poder completar un abordaje trans-sacro en una cirugía reglada, volteó al paciente a una posición en decúbito supino completando el procedimiento por vía trans-abdominal (220). Este procedimiento realizado de manera accidental marcó una nueva era en el tratamiento quirúrgico del cáncer de recto.

A pesar de los progresos realizados durante finales del siglo XIX y principios del XX, se fue prestando una atención creciente a las elevadas tasas de recaída local de la enfermedad, ya que la resección abdomino-perineal del recto se realizaba sin retirar el mesorrecto circundante.

Fue en este contexto cuando apareció la figura de William Ernest Miles (1869-1947), cirujano asistente en el *Royal Cancer Hospital* (hoy *Royal Marsden*) de Londres. Miles practicó diferentes métodos de resección del recto por vía perineal con unas tasas de recurrencia del 95% (tasas similares a las de sus coetáneos). Sin embargo, el estudio minucioso y sistemático de las autopsias de sus pacientes, y la observación del patrón de diseminación de la enfermedad en cada caso le llevó a la conclusión de que el abordaje perineal por sí solo no era adecuado (221). Para Miles, las tasas tan altas de recaída se debían a una extracción insuficiente de tejido, y por tanto, la cirugía debía conseguir no solo la resección en bloque del tumor primario, sino también del tejido ganglionar linfático proximal o regional alojado en el mesorrecto, así como en el mesenterio del colon pélvico (222).

Miles desarrolla una nueva técnica: la amputación abdomino-perineal. Esta técnica, que publica en 1908 (223), incluía: 1) realización de una colostomía permanente; 2) extirpación de todo el colon y el mesocolon pélvico situado por debajo de la arteria ilíaca común; 3) extirpación de los ganglios linfáticos situados sobre la bifurcación de las arterias ilíacas comunes y 4) extirpación de la porción perineal lo más radical posible. También presentó sus resultados en una serie de 12 pacientes con una tasa de mortalidad del 41,6%, tasa que teóricamente iría descendiendo de manera progresiva a medida que la técnica fuera perfeccionándose y se adquiriera un mayor control sobre la hemorragia y las complicaciones perioperatorias. En Estados Unidos, Charles Horace Mayo (1865-1939) desarrolló un método de resección similar (224), también con una elevada mortalidad en las primeras etapas de su implantación.

La operación de Miles estaba originalmente concebida para realizarse en un solo tiempo, pero debido a las elevadas tasas de infección y hemorragia, muchos cirujanos realizaron modificaciones en el procedimiento, ya que la resección exclusivamente perineal, aunque menos eficaz, resultaba mucho más sencilla que la operación de Miles y tenía menor mortalidad perioperatoria (221).

Entre ellos podemos destacar a John Percy Lockhart-Mummery (1875-1957), cirujano del *St. Mark Hospital*, que desarrolló una técnica de resección perineal en dos tiempos con una mortalidad del 3% y una tasa de supervivencia a 5 años de en torno al 50% (225). Unos resultados espectaculares que algunos han criticado argumentando que Lockhart-Mummery rechazaba el 50% de los casos al considerarlos irreseccables (222).

Otra alternativa a la técnica de Miles fue desarrollada por el cirujano francés Henri Albert Hartmann (1860-1952), profesor de cirugía en el *Hotel Dieu* de París, que consistía en preservar la parte distal del recto no afectada por el cáncer mediante la resección del colon sigmoide y del recto superior cerrando el muñón rectal restante y dejando una colostomía de descarga temporal. En una fase posterior, se realizaba la reconstrucción del tránsito intestinal (219). La técnica también conseguía reducir la morbimortalidad asociada con la escisión abdomino-perineal. Es justo señalar que esta técnica se conocía desde 1879, cuando el cirujano austriaco Carl Gussenbauer (1842-1903) lo realizó por primera vez (226).

#### **1.7.1.5 Preservación de esfínteres**

Una vez que la resección abdomino-perineal de Miles se implantó como la técnica estándar durante la primera mitad del siglo XX, la colaboración entre cirujanos y patólogos permitió refutar la teoría de *Miles* sobre el patrón de diseminación ganglionar linfática al observar que en la mayoría de los pacientes se limitaba al mesorrecto, y que aquellos tumores con diseminación distal, considerados como localmente avanzados, eran incurables solo con cirugía (222).

Es imprescindible destacar el papel de Cuthbert E. Dukes (1890-1977) que confirmó que la diseminación linfática lateral y descendente se produce únicamente en una minoría de pacientes con enfermedad avanzada y, además, estableció un sistema de clasificación pronóstico del CCR que se ha mantenido hasta nuestros días (227).

Paralelamente, surgió la necesidad de realizar una selección adecuada de los pacientes, ya que el procedimiento se realizaba con independencia de la distancia del tumor al margen anal y las secuelas derivadas de su naturaleza mutilante, con la necesidad de una colostomía permanente, hacía imperativo determinar en qué pacientes (fundamentalmente en aquellos con tumores de recto superior) un procedimiento menos invasivo sería igual de satisfactorio (220).

Aunque la mayoría de los cirujanos mostraba sus reservas ante técnicas “menos radicales”, convencidos del beneficio del procedimiento de Miles, gracias a la extensa investigación de Dukes, que demostró la seguridad de la preservación del esfínter, los esfuerzos continuaron para limitar las resecciones y preservar los esfínteres.

Desde 1930, Claude Dixon (1893-1968) introdujo la técnica de la resección anterior baja para tumores de recto y recto-sigma con el objetivo de preservar el esfínter anal. En 1948, presentó sus resultados en 426 pacientes intervenidos con una tasa de mortalidad del 5,9% y una supervivencia del 67,7% a cinco años (228), convirtiendo esta técnica en el estándar para los tumores de recto medio y superior. Respecto al margen quirúrgico, se consideró que una resección adecuada requería al menos 5 cm de margen de resección distal, si bien un número creciente de artículos mostraban que incluso un margen distal de solo 2 cm no comprometía la recaída local (229).

Por tanto, a finales de los años 70, la resección anterior baja se convirtió en el nuevo estándar de tratamiento mientras que la resección abdomino-perineal quedó limitada al tratamiento de los tumores de recto inferior (219).

#### **1.7.1.6 Extirpación total del mesorrecto (TME)**

Aunque el rechazo de la teoría de Miles sobre la diseminación linfática había permitido realizar cirugías más conservadoras con beneficios similares, a principios de los años 80 las tasas de recaída de la enfermedad seguían siendo bastante elevadas. En 1986, el patólogo inglés Philip Quirke correlacionó la afectación de los márgenes de resección circunferencial (MRC) y la recaída tras analizar 52 piezas quirúrgicas reseçadas con intención curativa en las que identificó afectación del MRC en 14 piezas. De estos 14 pacientes, 12 sufrieron una recaída pélvica posterior (230). Estudios posteriores confirmaron estos hallazgos (231,232) evidenciando la necesidad de mejorar la calidad de la cirugía rectal.

Fue Richard John Heald, también británico, quien en 1979 fué el pionero en desarrollar una nueva técnica quirúrgica que inicialmente tenía el objetivo de preservar tanto el aparato esfinteriano como el sistema nervioso autónomo (36). La técnica consistía en la resección completa del recto y el mesorrecto hasta los músculos elevadores del ano mediante una disección cuidadosa, evitando la rotura de la envoltura mesorrectal (37,233) (Figura 45).

Los resultados a largo plazo con esta técnica hablan por sí mismos. Con un seguimiento a 10 años, se consiguió una supervivencia específica por cáncer del 66%, una tasa de recidiva local del 4% y una supervivencia libre de enfermedad del 78% (35). Los planos quirúrgicos en la EMT de *Heald* tienen una base embriológica, ya que el mesorrecto tiene un origen embriológico diferente al tejido circundante.

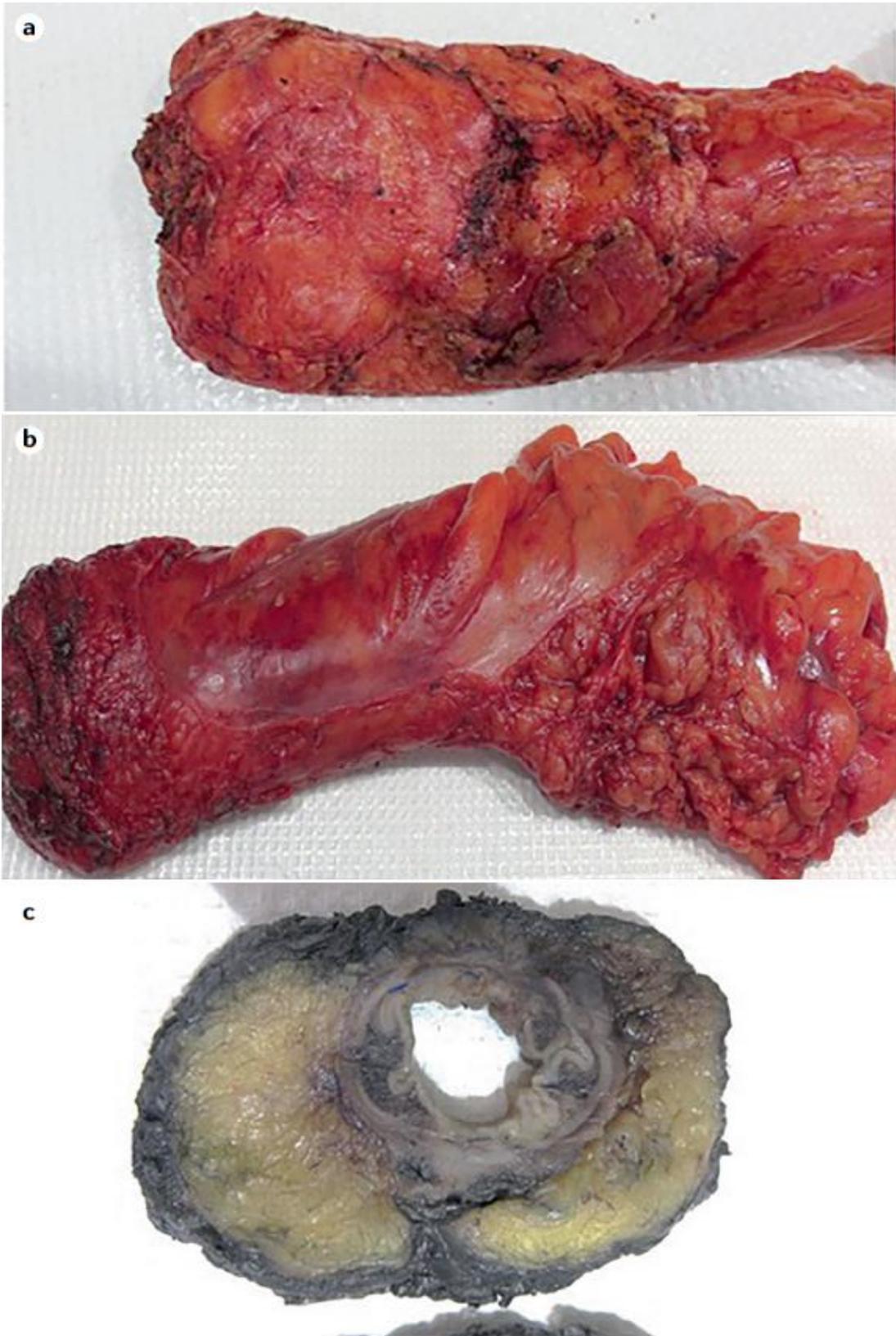
El desarrollo de manera paralela de técnicas que combinaban la TME con estrategias de preservación de los nervios autonómicos locales posibilitaron una mejora significativa en la calidad de vida de los pacientes operados, consiguiendo unas tasas de preservación de la función sexual de más del 86%, manteniendo el beneficio oncológico (5% de recaídas locales) (234).

Este beneficio, que fue confirmándose de manera sistemática en las series locales revisadas de distintos centros europeos (235) y americanos (236), así como la demostración del beneficio de la estandarización de la TME (237), convirtieron a esta técnica en el estándar de tratamiento quirúrgico para tumores de recto medio e inferior.

#### **1.7.1.7 Nuevas técnicas quirúrgicas**

Los avances tecnológicos desarrollados en las últimas décadas han ido incorporándose de manera progresiva a la cirugía del cáncer de recto, ya sea implementando algunas técnicas ya utilizadas en otros contextos, como la laparoscopia o la cirugía robótica, o desarrollando nuevas técnicas como la microcirugía endoscópica transanal (TEM) o la excisión total del mesorrecto transanal (TaTEM).

La cirugía laparoscópica es actualmente una técnica estándar en el tratamiento del cáncer colorrectal. Su utilización en cáncer de recto se remonta a 1990 (238). Sin embargo, los estudios comparativos con la cirugía abierta en este contexto han aportado resultados contradictorios, fundamentalmente a nivel de afectación del margen circunferencial o de una excisión incompleta del mesorrecto, donde el abordaje laparoscópico parece ser inferior (239–241). Esto ha sido confirmado en diferentes meta-análisis (242,243). No obstante, no pueden obviarse tampoco los beneficios que conlleva esta técnica en términos de morbilidad perioperatoria, requerimientos transfusionales y días de hospitalización. Finalmente, una revisión sistemática de la Cochrane (244) no pudo decantarse por uno u otro procedimiento con los datos disponibles.



**Figura 45.** Pieza quirúrgica de una excisión total del mesorrecto. Tomado de (245)

La cirugía robótica se ha comparado con la laparoscopia en diferentes meta-análisis objetivando una menor tasa de conversión a cirugía abierta a favor de la cirugía robótica (246) e incluso una menor tasa de positividad del margen circunferencial y menor incidencia de disfunción eréctil (247,248). No obstante, los resultados oncológicos y funcionales a largo plazo de la cirugía robótica parecen ser equivalentes a la cirugía laparoscópica (249), por lo que no parece existir un beneficio importante de esta técnica sobre la laparoscópica.

#### **1.7.1.8 Estrategia “Watch and wait”**

Para aquellos pacientes que tras recibir un tratamiento preoperatorio alcanzan una respuesta clínica completa (cCR) (ver 8.4.1. Biomarcadores clínicos), se han desarrollado estrategias de manejo conservador basadas en la observación y el seguimiento estrecho para evitar la morbilidad asociada al procedimiento quirúrgico y a las ostomías.

Algunos estudios retrospectivos y series de casos no objetivan diferencias en mortalidad específica por cáncer, supervivencia libre de enfermedad o supervivencia global entre los pacientes con cCR operados frente a la estrategia conservadora “*Watch and wait*” (250). Las tasas de recurrencia tumoral a dos años en estos pacientes oscilan en torno al 25%, si bien el 97% está localizado en la pared intestinal (251). No obstante, a pesar de estos resultados prometedores, a día de hoy no existen estudios randomizados maduros que demuestren que la estrategia de *Watch and wait* obtiene unas tasas de supervivencia global similares a los pacientes operados que alcanzan una cCR tras la neoadyuvancia.

Actualmente no existe un consenso unánime sobre si esta estrategia debería o no considerarse un estándar de tratamiento. Por tanto, a la espera de estudios definitivos, la estrategia *Watch and wait* debería considerarse una alternativa limitada a pacientes muy seleccionados y en el contexto de equipos multidisciplinares muy experimentados y con un protocolo de seguimiento muy estricto.

### **1.7.2 Tratamiento locorregional y sistémico: radioterapia y quimioterapia.**

#### **1.7.2.1 Tratamiento adyuvante**

Como se ha descrito anteriormente, la cirugía es la piedra angular del tratamiento del cáncer de recto. Sin embargo, únicamente con cirugía las tasas de recaída oscilan entre el 15-35% en pacientes con estadios T3N0 al 45-65% con estadios T3/4 N+ (252–254),

si bien estos datos son anteriores a la estandarización de la técnica de TME, a partir de la cual estas tasas descendieron hasta el 4-12%.

La radioterapia adyuvante fue utilizada en este contexto demostrando conseguir una disminución de las recidivas locales a 5 años en pacientes con estadios II y III, aunque sin diferencias en supervivencia global (SG) (255).

Los primeros estudios que evaluaron el papel de la quimioterapia basada en 5-fluorouracilo (5FU) más radioterapia frente a radioterapia adyuvante demostraron un beneficio de la combinación tanto en disminución de recaídas locorregionales y a distancia como en SG (256,257). A partir de estos estudios, la quimiorradioterapia (QRT) se estableció como el estándar de tratamiento adyuvante en los estadios II y III de cáncer de recto. Los estudios posteriores se encaminaron a discernir cuál era el mejor régimen de quimioterapia para realizar la concomitancia. El tratamiento con 5FU en infusión continua (5FUic), a dosis de 225mg/m<sup>2</sup>/día durante 5 semanas, demostró ser inicialmente superior al bolus en supervivencia libre de enfermedad y recaídas a distancia (258), aunque esto no se confirmó en estudios posteriores (259). Sin embargo, se mantuvo el 5FUic como QT de elección gracias a su mejor perfil de toxicidad (260).

### **1.7.2.2 Tratamiento neoadyuvante**

De manera paralela, también se fueron desarrollado estudios que evaluaron la aplicación de la RT de manera preoperatoria o neoadyuvante, debido a sus teóricas ventajas en cuanto a control de la enfermedad micrometastásica y la posibilidad de alcanzar un “*downstaging*” o disminución del tamaño tumoral que facilitara el abordaje quirúrgico posterior.

#### **1.7.2.2.1 Radioterapia neoadyuvate**

Los primeros estudios exploraron el papel de la RT preoperatoria administrada según el esquema de ciclo corto (SCRT), que administra 25Gy en 5 sesiones a 5Gy por sesión.

- El Stockholm I (261) comparó la SCRT seguida de cirugía frente a cirugía sola, demostrando una menor tasa de recidivas locorregionales para el brazo de la SCRT (16% vs 30%) sin beneficio ni en la tasa de metástasis a distancia ni en supervivencia global. La técnica de radioterapia utilizada incluía las regiones ganglionares para-aórticas y dos campos de irradiación.

- El Stockholm II (262) fue un ensayo con el mismo diseño al Stockholm I, si bien la técnica de radioterapia utilizada fue diferente (cuatro campos de irradiación y se omitían las regiones ganglionares). El estudio demuestra también un mejor control local para la SCRT (12% vs 25%) y en este caso un aumento en supervivencia global (46% vs 39%).
- El Swedish Rectal Cancer Trial (263) demostró unos resultados similares al Stockholm II tanto en recidivas locales (11% vs 27%) como en supervivencia global a 5 años (58% vs 48%).

Cabe destacar la elevada tasa de recidivas locales en el brazo del tratamiento quirúrgico exclusivo en estos estudios, lo que se atribuye a que la TME como cirugía estándar no se introdujo en Suecia hasta 1994, por lo que el beneficio de la SCRT no fue claramente aceptado hasta que estudios posteriores que incluían la TME como estándar quirúrgico, como el CKVO 9504 (264), demostraron que de igual manera la SCRT conseguía reducir la tasa de recaídas locales (2,4% vs 8,2%), aunque en este caso sin impactar en la supervivencia a dos años (82% vs 81,8%).

Se intentaron resolver las dudas acerca del beneficio en supervivencia de la RT preoperatoria con la publicación de un metaanálisis (265) de 14 estudios y más de 6.000 pacientes. Este estudio demostró que la RT preoperatoria frente a la cirugía, confería un mejor control local (OR: 0,49) y una mejor supervivencia global a 5 años (OR: 0,84) sin disminuir la tasa de metástasis a distancia. El propio metaanálisis reconoció que la magnitud del beneficio era pequeña y entre las críticas al mismo se encuentra la gran variabilidad de fraccionamientos de RT de los estudios incluidos (entre 5 y 45Gy).

Recientemente, se han publicado los datos del estudio Stockholm III (266) que comparó tres esquemas de RT preoperatoria: SCRT (25Gy en 5 días) seguido de cirugía a la semana de finalización (SRT), el mismo esquema seguido de cirugía a las 4-8 semanas (*SRT-delay*) y LCRT (50Gy en 25 sesiones) y cirugía a las 4-8 semanas (*LRT-delay*). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en recidiva local ni en supervivencia global. Al comparar los dos brazos de SCRT, se objetivaron menos complicaciones postoperatorias en el brazo *SRT-delay* frente a SRT (OR: 0,61), lo que consolida la estrategia de la cirugía diferida como una alternativa a la cirugía inmediata.

En 2018, la Cochrane publicó un metaanálisis (267) evaluando el papel de la SCRT seguido de cirugía frente al tratamiento quirúrgico exclusivo concluyendo que hay un beneficio en la reducción de las recurrencias locales con la SCRT, aunque el impacto en supervivencia es muy pequeño o prácticamente nulo en el subgrupo de pacientes operados con TME, técnica estándar en la actualidad.

#### **1.7.2.2.2 Quimiorradioterapia neoadyuvante**

La adición de quimioterapia a la RT neoadyuvante ha demostrado un mejor control local y un aumento de la tasa de respuestas completas patológicas (pCR) en el brazo de la QRT frente al de la RT, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ni en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) ni en la SG entre ambos brazos (268–270):

- El estudio polaco (268) comparó el esquema de SCRT (25Gy en 5 sesiones) frente a la LCRT (50,4Gy en 28 sesiones a 1,8Gy por sesión) concomitante con quimioterapia (20mg/m<sup>2</sup> de leucovorin – LV – al día y 5FU 325mg/m<sup>2</sup> al día, administrados en *bolus* durante 5 días seguidos las semanas 1<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> de la RT. La cirugía (TME) se realizaba a las 4-6 semanas de finalizar el tratamiento anterior. No se objetivaron diferencias en SLE ni en SG, ni en la tasa de preservación de esfínteres a pesar de un mayor *downstaging* tumoral en el grupo de la QRT (271). La toxicidad aguda fue mayor con la QRT.
- En el estudio francés FFCD 9203 (269), el régimen de radioterapia utilizado fue un LCRT y similar en ambos brazos (45Gy en 25 sesiones durante 5 semanas). El esquema de QT concomitante fue idéntico al del estudio polaco (*bolus* 5FU/LV días 1-5 durante la 1<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> semanas de LCRT). Los resultados demostraron una mayor tasa de respuestas completas patológicas para el brazo de la QRT (11,4% vs 3,6%) y una menor tasa de recidivas locales (8,1% vs 16,5%), que sin embargo no se tradujeron ni en una mayor tasa de conservación de esfínteres, ni tampoco en una mejora en la SG a 5 años.
- El estudio de la EORTC 22921 (270), con un diseño de cuatro brazos, donde también se evaluaba el papel de la QT adyuvante, obtuvo resultados semejantes a los anteriores. Todos los brazos recibían un régimen de LCRT (45Gy en 25 sesiones; 5 semanas), dos de ellos con QT concomitante con *bolus* de 5FU/LV y dos de ellos recibían 4 ciclos de QT adyuvante cada tres semanas con el mismo esquema y dosis utilizadas preoperatoriamente.

Los resultados del QRT preoperatoria siguieron demostrando una menor tasa de recidivas locales que se mantuvieron en el seguimiento a 10,4 años (272) (11,7% con QRT sin QT adyuvante; 11,8% con QRT y QT adyuvante vs 22,4% con RT sin QT adyuvante y 14,5% con RT y QT adyuvante). No se objetivaron diferencias ni en SG ni en SLE a 10 años. Con estos resultados, el papel de la QT adyuvante quedó en entredicho.

En 2012 se publicó un análisis combinado del EORTC 22921 y el FFCD 9203 con 11.767 pacientes que confirman que la QRT neoadyuvante mejora las tasas de recidiva local y respuestas patológicas, pero no aumentaban la SLE o SG a 5 años por lo que no podían considerarse marcadores subrogados de supervivencia (273).

La *Cochrane Database* ha publicado en este contexto dos metaanálisis comparando la QRT preoperatoria frente a la RT. El primero (274) engloba 6 ensayos randomizados y confirma una reducción en la recurrencia local en el grupo de QRT frente al de RT, con mayor toxicidad aguda en el grupo de la combinación; y el segundo (275) con 5 ensayos en los que se confirma un aumento de la toxicidad aguda y morbilidad quirúrgica aunque con un incremento en la tasa de pCR y menor recidiva local en el grupo de QRT, confirmando a la QRT como un estándar de tratamiento preoperatorio.

Una vez establecida la superioridad de la QRT frente a la RT el siguiente paso fue determinar si el mejor momento para su administración era antes (neoadyuvante) o después (adyuvante) de la cirugía. Tres estudios exploraron esta cuestión: RTOG 94-01, NSABP R-03 y AIO-94. Los dos primeros se cerraron de manera prematura debido al bajo reclutamiento, si bien el NSABP R-03 publicó sus resultados:

- El NSABP R-03 (276) aleatorizó a 267 pacientes con adenocarcinoma de recto T3/T4 o N+ (de los 900 previstos) a recibir tratamiento neoadyuvante basado en un ciclo de QT con 5FU 500mg/m<sup>2</sup> y LV 500mg/m<sup>2</sup> cada 6 semanas, seguido de LCRT (45Gy en 25 sesiones con un boost de 5,4Gy) concomitante con 5FU (325mg/m<sup>2</sup>) y LV (20mg/m<sup>2</sup>) la 1ª y 5ª semana de radioterapia, seguido de cirugía, o el mismo tratamiento administrado de manera adyuvante. Ambos brazos recibían 4 ciclos de QT posteriormente (el primer brazo tras la cirugía, el segundo brazo tras la QRT) con el mismo esquema.

El estudio demostró un beneficio del QRT neoadyuvante frente a la adyuvante en SLE a 5 años (65% vs 53%) y una tendencia no significativa en SG a 5 años (75% vs 66%;  $p = 0,065$ ) sin diferencias estadísticamente significativas en recidiva local a 5 años, ni en la tasa de conservación de esfínteres. Con respecto a la tolerancia, destaca una elevada tasa de toxicidad gastrointestinal grado 4 (24% vs 13%) para el brazo del tratamiento neoadyuvante. El estudio ha recibido numerosas críticas, destacando el bajo reclutamiento, la no obligatoriedad de una cirugía basada en TME, y la utilización de campos de radioterapia más amplios que los utilizados en los estudios europeos.

- El estudio fase III alemán CAO/ARO/AIO-94 (277) comparó el tratamiento de LCRT (50,4Gy a 1,8Gy por sesión 5 días a la semana más un boost de 5,4Gy) concomitante con 5FUic de 120h (1000mg/m<sup>2</sup>/día durante la 1<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> semana de radioterapia) antes y después de la cirugía basada en TME. Los pacientes recibían 4 ciclos de QT adyuvante con 5FU bolus (500mg/m<sup>2</sup>) a las 4 semanas de finalizar la cirugía o la QRT según el brazo. El estudio demostró un mayor control local (6% vs 13%) y una menor toxicidad aguda grado 3/4 (27% vs 40%) y crónica (14% vs 24%) de la QRT preoperatoria. No se objetivan diferencias en SLE, incidencia de metástasis a distancia y SG entre ambos brazos. Estos resultados se mantuvieron a los 11 años de seguimiento (278).

Respecto al tipo de quimioterapia utilizada en la concomitancia, la tendencia ha ido evolucionando de manera paralela al igual que se ha hecho en el tratamiento de la enfermedad avanzada o en la adyuvancia, pasando del bolus de 5FU al 5FUic, y de ahí a la capecitabina, una fluoropirimidina oral que ha demostrado su no inferioridad frente al 5FUic tanto en enfermedad avanzada (279) como en adyuvancia (280). Algunos estudios posteriores en el contexto neoadyuvante de cáncer de recto han avalado su uso (281,282), por lo que a día de hoy se considera un tratamiento estándar.

Más dudas existen sobre el beneficio de la QT adyuvante tras un tratamiento de QRT preoperatorio. Varios estudios no han conseguido demostrar mejor SLE o SG de la quimioterapia adyuvante basada en fluoropirimidinas (272,283,284) en monoterapia o combinadas con oxaliplatino (285).

Finalmente, un metaanálisis de estos 4 estudios con casi 1.200 pacientes demostraba que no mejoraba la SLE, la SG o las recidivas a distancia, si bien se dejaba abierto que pudiera existir algún subgrupo que pudiera beneficiarse (286). De todas formas, cada día hay más evidencia que apoya el nulo beneficio de la QT adyuvante en estadios patológicos iniciales tras la cirugía ypT0-1(287) e ypT0-2(288).

Toda esta evidencia acumulada se vio reflejada en las guías de tratamiento del cáncer de recto de todas las sociedades oncológicas nacionales e internacionales. Merece la pena traer a colación, merced a la representatividad de las mismas y la repercusión que tuvieron, las guías de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) (196) que llegaban a orientar el tratamiento de acuerdo a cinco grupos de riesgo establecidos, algunos de ellos que coloquialmente denominados como “*el bueno, el feo y el malo*”, en función de sus características clínicas, patológicas y radiológicas (Figura 47).

Risk group	TN substage	Possible therapeutic options	Further considerations
Very early	cT1 sm1 N0 (on ERUS and MRI)	Local excision (TEM) If pT1 and no adverse features, TEM is sufficient If adverse histopathology (sm $\geq$ 2, G3, V1, L1), requires radical resection (TME) as standard	Alternatively, in the case of adverse features on pathology, TEM plus salvage (or adjuvant) CRT in perioperative high-risk patients (but unproven benefit—with high risk of local recurrence for pT2)
Early (Good)	cT1-cT2; cT3a/b if middle or high, N0 (or also cN1 if high), MRF clear, no EMVI	Surgery (TME) alone is standard. If unexpected poor prognostic signs on histopathology (CRM+, extranodal/N2), consider postoperative CRT/CT (see postoperative recommendations in Table 7)	For fragile, high-risk patients or those rejecting radical surgery (CRT with evaluation, local excision or if achieving cCR, 'watch-and-wait', organ preservation)
Intermediate	cT3a/b very low, levators clear, MRF clear or cT3a/b in mid- or high rectum, cN1-2 (not extranodal), no EMVI	Surgery (TME) alone is a standard only if good-quality mesorectal resection assured (and local recurrence $\leq$ 0.5% or, if not, preoperative SCPRT (5 $\times$ 5 Gy) or CRT followed by TME	If CRT is given and cCR is achieved, 'watch-and-wait' in high-risk patients for surgery may be considered
Bad	cT3c/d or very low localisation levators threatened, MRF clear cT3c/d mid-rectum, cN1-N2 (extranodal), EMVI+, limited cT4aN0	Preoperative SCPRT (5 $\times$ 5cGy) or CRT followed by TME, depending on need for regression	If CRT and cCR achieved, 'watch-and-wait' in high-risk patients may be considered
Advanced (Ugly)	cT3 with any MRF involved, any cT4a/b, lateral node+	Preoperative CRT followed by surgery (TME and more extended surgery if needed due to tumour overgrowth), or preoperative SCPRT (5 $\times$ 5 Gy) plus FOLFOX and delay to surgery	Alternatively, 5 $\times$ 5 Gy alone with a delay to surgery in fragile/elderly or in patients with severe comorbidity who cannot tolerate CRT

**Figura 47. Recomendación de tratamiento en función de la categoría de riesgo. (196)**

Los recientes avances en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas han dejado obsoletas las guías ESMO, las cuales están actualmente en proceso de revisión. Sin embargo, las actuales guías abren la puerta al tratamiento neoadyuvante total como una opción en el grupo de tumores más avanzados (los feos).

### 1.7.2.2.3 Tratamiento neoadyuvante total (TNT)

Se trata de una nueva estrategia de tratamiento multimodal desarrollada en los últimos años consistente en la intensificación del tratamiento preoperatorio. Dicha estrategia se fundamenta sobre las siguientes bases (289):

- a) Los pacientes con tumores y características de alto riesgo siguen sufriendo recaídas a pesar de un correcto tratamiento preoperatorio y a una adecuada cirugía basada en TME. De hecho, la supervivencia en estadios III no se ha modificado si comparamos los periodos de 2005-2009 y 2010-2014(290).
- b) En pacientes tratados con QRT neoadyuvante, la quimioterapia adyuvante no ha demostrado ningún tipo de beneficio en supervivencia (286), como ya se ha comentado anteriormente.
- c) La radioterapia posee un efecto antitumoral tiempo-dependiente que permite dilatar la cirugía varias semanas y que favorece la respuesta patológica. En el estudio Stockholm III (291) hasta un 10% de los pacientes con la estrategia *SRT-delay* (SCRT seguido de cirugía a las 4-8 semanas) alcanzaron la respuesta completa patológica (pCR). Este tiempo de espera permitiría introducir la quimioterapia con el fin de aumentar las respuestas patológicas.
- d) Una mayor tasa de respuestas clínicas completas (cCR) abriría la puerta a que pacientes seleccionados pudieran acogerse a estrategias del tipo “*watch & wait*” que ha demostrado en los últimos años su factibilidad y buenos resultados tanto desde el punto de vista pronóstico como de calidad de vida (251).

En 2021 se publicaron los resultados de dos estudios fase III randomizados con dos estrategias multimodales diferentes y que condujeron a que el TNT sea considerado en el momento actual un nuevo estándar de tratamiento (Figura 48):

- RAPIDO (292): estudio multicéntrico de 912 pacientes con dos brazos:
  - o Brazo control: LCRT (50,4Gy en 25 sesiones a 1,8Gy por sesión o 50Gy a 2Gy por sesión) concomitante con capecitabina oral (825mg/m<sup>2</sup>) y cirugía (TME) a las 6-10 semanas. A las 6-8 semanas de la cirugía los pacientes recibían quimioterapia adyuvante con 8 ciclos de XELOX o FOLFOX4, a elección del investigador.

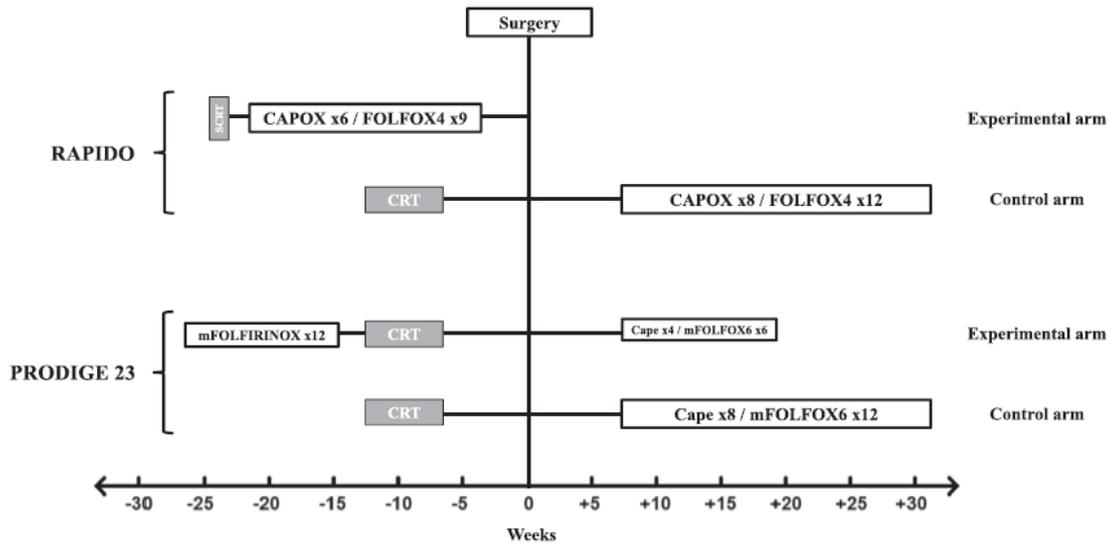
- Brazo experimental: SCRT (5 sesiones de 5Gy/sesión). A los 11-18 días iniciaban quimioterapia de consolidación con 6 ciclos de XELOX o 9 ciclos de FOLFOX y cirugía (TME) a las 2-4 semanas tras la QT.

La proporción de tumores T3/T4 fue del 65,8%/31,1% y un 91,6% de pacientes presentaban afectación ganglionar, un 61% afectación de fascia mesorectal y un 29,9% presentaban invasión venosa intramural (EMVI).

La probabilidad acumulada de fracaso del tratamiento relacionada con la enfermedad (DTRF), objetivo primario del estudio, fue favorable al brazo control con un 23,7% vs 30,4% (HR: 0,75). También se demostró un beneficio estadísticamente significativo para la estrategia TNT en la tasa de pCR (28% vs 14%; OR: 2,37) y probabilidad acumulada de metástasis a distancia a 3 años (HR: 0,69). No se objetivaron diferencias ni en recidiva local ni en SG a 3 años. La toxicidad G3-5 fue mayor durante el tratamiento neoadyuvante (48% vs 25%).

- PRODIGE 23 (293): estudio francés con 461 pacientes aleatorizados a:
  - Brazo control: LCRT (50Gy a 2Gy por sesión en cinco semanas) concomitante con capecitabina oral (800mg/m<sup>2</sup>) y cirugía (TME) a las 6-8 semanas. A las 5-12 semanas de la cirugía los pacientes recibían quimioterapia adyuvante con 12 ciclos de mFOLFOX6 a elección del investigador con independencia de la respuesta patológica obtenida.
  - Brazo experimental: QT de inducción con FOLFIRINOX (Oxaliplatino 85mg/m<sup>2</sup>, LV 400mg/m<sup>2</sup>, irinotecan 180mg/m<sup>2</sup> y 5FUic 2400mg/m<sup>2</sup> durante 46h) SCRT (5 sesiones de 5Gy/sesión) cada 14 días durante 6 ciclos. Entre 1-3 semanas después del último ciclo, recibían QRT con esquema similar al brazo control y por último la cirugía (TME) tenía lugar a las 6-8 semanas de finalizar la QRT.

La proporción de tumores T3/T4 fue 82,2%/12,8% y el 89,6% de los pacientes presentaban afectación ganglionar y un 27% presentaban afectación de la fascia mesorectal.



**Figura 48. Diseño de los estudios PRODIGE 23 y RAPIDO Trial. Tomado de (294)**

El estudio demostró su objetivo primario, con un beneficio estadísticamente significativo a favor del brazo experimental con una SLE a tres años de 76% vs 69%. La tasa de pCR fue mayor para el brazo de la TNT (28% vs 12%). Al igual que en el estudio RAPIDO, también la supervivencia libre de metástasis fue favorable al brazo experimental (79% vs 72%) sin objetivar de nuevo diferencias en control local ni en SG.

Actualmente las dos estrategias de TNT se han incorporado a los algoritmos terapéuticos de los pacientes con tumores de recto localmente avanzados. Sin embargo, algunas cuestiones permanecen todavía sin respuesta como, por ejemplo, los criterios de selección de pacientes para cada estrategia, la duración necesaria de la quimioterapia de consolidación (RAPIDO), el beneficio del triplete frente al doblete en la quimioterapia de inducción (PRODIGE-23), o el valor de la QT adyuvante tras una QT de inducción. Estas cuestiones deberían ser el objetivo de estudios futuros.

#### **1.7.2.2.4 Inmunoterapia neoadyuvante**

Dentro del CR, existe un 13%-15% de pacientes según las series (295,296), que presentan defectos en el sistema de reparación del DNA (dMMR), lo que se traduce en una elevada MSI. Este subgrupo de pacientes se ha asociado con una mayor tasa de pCR y pronóstico favorable (297) aunque existen resultados contradictorios (298). Por otro lado, tenemos evidencia de la eficacia de la inmunoterapia en pacientes con CCR y dMMR-MSI con elevadas tasas de respuestas y de pCR (299,300).

En LARC, tenemos los datos recientemente publicados de un pequeño estudio (301) donde 12 pacientes con LARC y dMMR recibieron tratamiento neoadyuvante con dostarlimab (500mg cada tres semanas) durante 6 meses. El protocolo del estudio contemplaba que los pacientes recibieran posteriormente QRT y cirugía. Sin embargo, a los 6 meses de tratamiento los 12 pacientes presentaron una respuesta clínica, radiológica, patológica y metabólica completa, por lo que no tuvieron que recibir ni QRT ni cirugía. No se reportaron toxicidades grado 3 o mayores. A la espera del seguimiento a largo plazo, la elevada tasa de pCR en este subgrupo de pacientes abre la puerta a estrategias de *watch and wait*, aunque a día de hoy no puede considerarse un tratamiento estándar.

### **1.8 Biomarcadores en cáncer de recto localmente avanzado (LARC)**

En cáncer de recto localmente avanzado se han descrito numerosos biomarcadores con la capacidad potencial de predecir la respuesta o pronosticar la evolución clínica. Sin embargo, su aplicabilidad sigue siendo dificultosa tanto por tratarse de estudios con pequeños tamaños muestrales, como por la dificultad de determinar su validación.

#### **1.8.1 Definición de biomarcador**

La palabra biomarcador es una suerte de acrónimo para “*marcador biológico*” y de manera muy general, se podría definir como el conjunto de características objetivas y cuantificables de una enfermedad (302) que pueden medirse con precisión y reproducibilidad.

El “*Biomarker Working Group*” de la FDA y el NIH americano desarrollaron en 2015 la herramienta BEST (*Biomarkers, EndpointS and other Tools*) que incluía un glosario con el objetivo de armonizar y clarificar la terminología, distinguir las diferencias entre biomarcadores y valoraciones clínicas, su papel en la investigación médica y práctica clínica, así como el desarrollo, regulación y aprobación de productos (303). BEST amplía la definición de biomarcador:

*“Una característica definida y cuantificable como un indicador de procesos biológicos normales, patogénicos o como respuesta a una exposición o intervención, incluidas las intervenciones terapéuticas. Las características moleculares, histológicas, radiológicas o fisiológicas pueden ser biomarcadores. Un biomarcador no es una evaluación de cómo siente o actúa un paciente, ni tampoco de su supervivencia”*(304).

### **1.8.2 Diferencia entre biomarcador pronóstico y predictivo**

Un biomarcador pronóstico es aquel que proporciona información prospectiva sobre la evolución de un paciente (305). El diccionario del *National Cancer Institute* (NCI) americano lo define como la “*situación, afección o característica del paciente que puede usarse para calcular la probabilidad de recuperación de una enfermedad o la probabilidad de que la enfermedad recidive (vuelva)*” (306).

Un biomarcador predictivo es aquel que ayuda a predecir la probabilidad de respuesta a un tratamiento específico (305). Según el NCI se entiende como factor predictivo la “*afección u observación que ayuda a predecir si el cáncer de una persona responderá a un tratamiento específico. Un factor predictivo (predisponente) también puede describir algo que aumenta el riesgo de una persona de presentar una afección o enfermedad*” (307). Si bien el NCI recoge estas dos acepciones de factor predictivo, en nuestro trabajo, cuando hablemos de factor predictivo nos acogeremos a la primera acepción.

### **1.8.3 Biomarcadores pre-QRT neoadyuvante**

#### **1.8.3.1 Biomarcadores clínicos**

Se han descrito varios biomarcadores clínicos pronósticos y predictivos de la respuesta al tratamiento neoadyuvante de QRT.

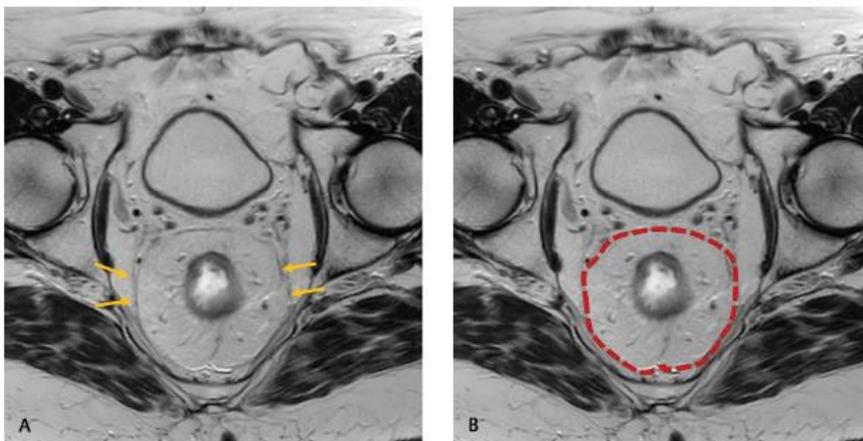
- Edad: el diagnóstico de un LARC antes de los 40 años se ha asociado a una menor tasa de respuestas completas patológicas (308) y en menores de 50 años a un mayor riesgo de recidiva local y peor supervivencia libre de enfermedad (309). Por el contrario, los pacientes mayores de 70 años se benefician por igual del tratamiento neoadyuvante sin perjuicio alguno en supervivencia (310,311).
- Estado funcional: determinado por las escalas ECOG o PS (Performance Status) (312). Un peor estado funcional se correlaciona con una peor supervivencia.
- Índice de masa corporal (IMC): la obesidad ( $IMC \geq 30 \text{ mg/Kg}^2$ ) y el bajo peso ( $IMC < 18.5 \text{ Kg/m}^2$ ) parecen conferir una peor respuesta al tratamiento neoadyuvante con un menor *downstaging* y regresión tumoral (313,314), una menor tasa de conservación de esfínteres (315), y algunos estudios también los asocian con una peor supervivencia libre de enfermedad (316).

- Localización y extensión tumoral circunferencial: los LARC de localización anterior parecen tener un mayor porcentaje de pCR que los de otras localizaciones, aunque sin impacto en supervivencia (317). La distancia al margen anal también se ha asociado con la respuesta, siendo los tumores localizados a menos de 5cm, especialmente aquellos con afectación del complejo esfinteriano, los de peor respuesta y pronóstico (318). También se ha descrito que una menor extensión tumoral en la circunferencia rectal (<50-60%) se asocia con una mayor regresión tumoral y una mejor supervivencia libre de enfermedad y global (319,320).

### 1.8.3.2 Biomarcadores de imagen

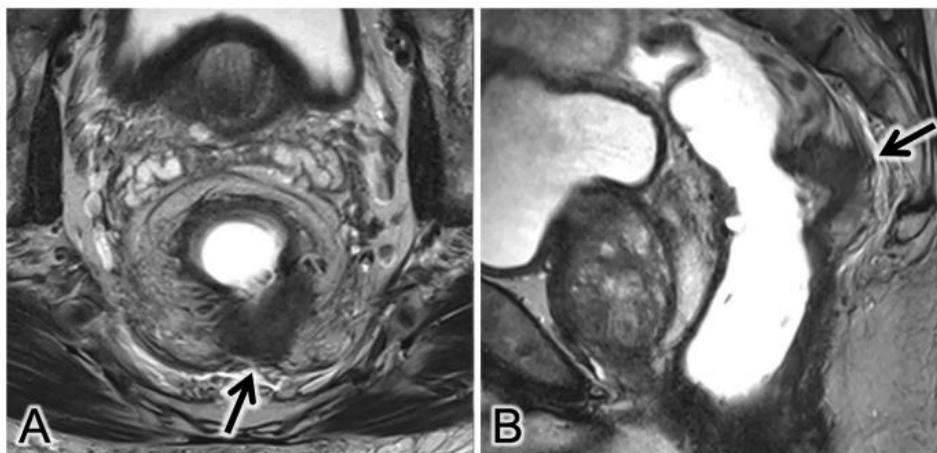
Algunos datos sobre las características tumorales y su relación con las estructuras anatómicas adyacentes que aportan las pruebas complementarias de imagen también han sido evaluados como potenciales biomarcadores.

- RMN pélvica: prueba indispensable en el diagnóstico inicial y en la evaluación de respuesta a la neoadyuvancia [ver apartado 6.2.4.3 Resonancia Magnética nuclear (RMN)]. Define los siguientes parámetros:
  - Margen de resección circunferencial (MRC): se define como el plano por el que los cirujanos deben realizar la disección de la TME (321). Se corresponde con la circunferencia completa de la fascia mesorrectal, y en los tumores de recto que se extienden hasta canal anal con el plano interesfinteriano, continuidad inferior de la fascia mesorrectal (Figura 48).



**Figura 49. Margen de la fascia mesorrectal en flechas amarillas (izquierda) y línea roja discontinua (derecha). Tomado de (322).**

La valoración del MRC se realiza midiendo la distancia más corta entre la parte más externa del tumor rectal y el margen circunferencial. Se considera que el MRC está afectado si el tumor se encuentra a menos de 1mm del mismo y potencialmente amenazado si está entre 1 y 2mm (323,195). Una distancia más de 1mm es un biomarcador pronóstico de márgenes libres después de la cirugía (324). Por el contrario, un MRC positivo es un biomarcador pronóstico de mayor probabilidad de recidiva local y peor supervivencia libre de enfermedad y global (325,326). Se considera además uno de los criterios de indicación de tratamiento neoadyuvante (196) (Figura 50)



**Figura 50. Secuencias de RM T2 axial (a) y sagital (b) que muestran un cáncer de recto medio con afectación posterior del MRC (flechas). Tomado de (327).**

- Invasión extramural vascular (EMVI): es la infiltración tumoral de los vasos sanguíneos del mesorrecto. Es un factor de mal pronóstico de recaída local y a distancia, así como de peor supervivencia (328–332). Radiológicamente se caracteriza por un engrosamiento focal en tamaño o intensidad del vaso infiltrado, así como por irregularidad en su pared (195) (Figura 51).

Estadio cTNM: (ver 6.3. Estadificación). El tamaño tumoral (T) y la afectación ganglionar (N) determinados por RMN son biomarcadores pronósticos. La valoración de la afectación ganglionar por RMN es más imprecisa, ya que para la correcta evaluación de los ganglios es necesario valorar no solo el tamaño sino también otras características morfológicas de malignidad, como la irregularidad de los bordes o la intensidad de señal (195).

La afectación ganglionar valorada por RMN no ha conseguido demostrar ser un factor de mal pronóstico al igual que el MRC y el EMVI, aunque si que es un criterio de indicación de QRT neoadyuvante (196,333). La presencia de lo que se conoce como depósitos tumorales (categoría N1c), definidas como acúmulos de células tumorales sin evidencia de infiltración vascular o linfática también se ha descrito como factor de mal pronóstico (332),



**Figura 51. Imágenes sagitales de RM (a y b) que muestran signos radiológicos de EMVI (flechas). Tomado de (195).**

- **Sarcopenia:** la sarcopenia es un síndrome que provoca la pérdida progresiva y generalizada de la masa muscular. La edad avanzada, la falta de ejercicio, y una nutrición inadecuada, así como enfermedades inflamatorias y el cáncer pueden provocar su aparición (334). Suele evaluarse en base al índice de masa muscular esquelética (SMI) medido por RMN, TAC o DEXA, bioimpedancia o ultrasonidos (335).

En cáncer de recto, la sarcopenia se ha asociado con menor *downstaging* y menor tasa de pCR (336), pero también se ha demostrado un factor pronóstico independiente de peor supervivencia en pacientes no sarcopénicos que tras la QRT desarrollan sarcopenia (337,338).

### **1.8.3.3 Biomarcadores analíticos**

#### **1.8.3.3.1 Marcadores tumorales**

- **Antígeno carcinoembrionario (CEA).**

El CEA es una glicoproteína oncofetal que en condiciones normales se detecta en pequeñas cantidades en sangre (<5 ng/mL). Su elevación se asocia a tumores gastrointestinales sobre todo el cáncer colorrectal. Los niveles de CEA pre-QRT neoadyuvante se han correlacionado con la respuesta patológica tras la cirugía (a niveles más elevados de CEA, peor respuesta) y ha demostrado ser un factor pronóstico independiente de supervivencia (339–344).

- **Antígeno carbohidrato 19.9 (Ca19.9).**

El Ca19.9 es una proteína de la superficie celular que puede elevarse en presencia de tumores del tracto gastrointestinal. El intervalo de referencia de normalidad oscila entre 0 y 35 U/mL. Aunque es menos específica del CCR, algunos estudios han demostrado su papel como biomarcador en LARC. En un estudio de 303 pacientes, los niveles elevados de CA19.9 al diagnóstico se correlacionaron con peor supervivencia y como factor predictivo de beneficio a QT adyuvante (345).

#### **1.8.3.3.2 Marcadores de respuesta inflamatoria sistémica**

El sistema inmunológico elabora una respuesta sistémica ante situaciones de estrés quirúrgico, enfermedades inflamatorias sistémicas como el cáncer o cuadros sépticos entre otros (346). Dentro de esta respuesta, se producen de manera característica alteraciones en los niveles relativos de los leucocitos circulantes, fundamentalmente neutrofilia y linfopenia (347), así como del número de plaquetas en forma de trombocitosis (348).

La combinación de estas alteraciones hematológicas expresadas en forma de *ratios* [neutrófilo/linfocito (NLR), linfocito/monocito (LMR) y plaquetas/linfocito (PLR)] ha sido evaluada como biomarcador en pacientes críticos ingresados en unidades de intensivos (349–351), enfermedades cardiovasculares (352–354), neurológicas (355–357), infecciosas (358,359) (incluido el COVID (360,361)) y por supuesto oncológicas (362–364). Sin embargo, la variabilidad de los puntos de corte en cada una de las ratios, los resultados contradictorios y la heterogeneidad de los estudios ha dificultado su utilización en la práctica clínica. Los datos de estas ratios como biomarcadores en LARC son los siguientes:

- **Ratio neutrófilo/linfocito (NLR)**

La evidencia sobre el valor pronóstico de NLR en LARC es contradictoria. Un elevado NLR se ha asociado con una peor respuesta patológica a la QRT neoadyuvante (365,366) y peor SLE y SG (367–370). Sin embargo, otros estudios no han demostrado utilidad predictiva de respuesta (371) ni pronóstica de supervivencia (372,373).

- **Ratio linfocito/monocito (LMR)**

Una baja ratio LMR pre-QRT neoadyuvante se ha correlacionado de manera inversa con la tasa de pCR (374) y con un mal pronóstico en supervivencia (374–377).

- **Ratio plaquetas/linfocitos (PLR)**

Una elevada ratio PLR parece ser un factor de mal pronóstico de SLE y SG (378,379), pero los resultados con esta ratio también son contradictorios (377).

#### **1.8.3.4 Biomarcadores anatomo-patológicos**

##### **1.8.3.4.1 Grado tumoral**

El grado de diferenciación tumoral de los adenocarcinomas de recto (Ver 6.2.3 Biopsia) es una variable pronóstica de supervivencia con independencia del estadio (380–382,191). Un alto grado de diferenciación tumoral (pobremente diferenciado – G3) se ha asociado con un elevado riesgo de recidiva a distancia y una peor supervivencia global (383) y se ha sugerido que pudiera ser un factor a considerar a la hora de decidir la administración de quimioterapia adyuvante tras la cirugía (302).

##### **1.8.3.4.2 Inestabilidad de microsatélites (MSI)**

La presencia del estatus dMMR/MSI [ver 3.3.2 Inestabilidad de microsatélites (MSI)] parece ser un biomarcador predictivo y pronóstico:

- Como biomarcador predictivo, los pacientes con dMMR/MSI presentan una peor respuesta a la quimioterapia (298,384). Esto ya había sido descrito en el contexto del tratamiento adyuvante del CCR en estadios II, donde la población MSI no parece beneficiarse del tratamiento con fluoropirimidinas (385). Por el contrario, estos pacientes parecen ser más sensibles que la población pMMR/MSS a la QRT (386–388,298), aunque no todos los estudios han conseguido demostrarlo (389–391)

- Como biomarcador pronóstico, parece conferir un mejor pronóstico a largo plazo comparando con los pacientes con pMMR/MSS con mejores tasas de supervivencia libre de progresión y supervivencia global (386,388,384,392).

Estos datos confirman la utilidad de la determinación del estatus de MSI a la hora de elegir la opción más adecuada de tratamiento neoadyuvante, teniendo en cuenta las nuevas opciones de tratamiento con la estrategia TNT [Ver 7.2.2.3 Tratamiento neoadyuvante total (TNT)] y la excelente respuesta de estos tumores a la inmunoterapia neoadyuvante (Ver 7.2.2.4 Inmunoterapia neoadyuvante).

#### **1.8.3.4.3 Mutaciones en KRAS/BRAF**

Como biomarcador predictivo, las mutaciones en KRAS [Ver 3.2.2 RAS (Rat sarcoma virus)] aportan información contradictoria ya que hay estudios que encuentran una menor tasa de respuestas en la población KRAS mutada a la QRT neoadyuvante (393–396), otros que demuestran que esa resistencia solo se da cuando las mutaciones de KRAS se producen en el codón 13 (397,398), y otros directamente niegan su carácter predictivo (399–402)

Respecto a su papel pronóstico, se ha demostrado el mal pronóstico que confieren las mutaciones de KRAS en CCR avanzado (403). Este papel también ha sido descrito en pacientes con LARC tratados con QRT neoadyuvante (404,401,405), aunque la evidencia tampoco es unánime (400,406).

Las mutaciones en BRAF V600E se asocian fundamentalmente a tumores de colon proximal y parecen conferir resistencia a los tratamientos y peor supervivencia en el contexto de enfermedad avanzada (407–409). En LARC, estas mutaciones son poco frecuentes y parecen conferir un pronóstico adverso (410,411).

#### **1.8.3.5 Biomarcadores genómicos y transcriptómicos**

El *National Human Genome Research Institute* define la expresión génica o genómica como “el proceso por el cual la información codificada por un gen se usa para producir moléculas de RNA que codifican (...) proteínas o (...) de RNA no codificantes que cumplen otras funciones” (412); mientras que por transcriptoma, se entiende el conjunto de moléculas de RNA (transcritos, de ahí su nombre) de una célula en un momento determinado (413).

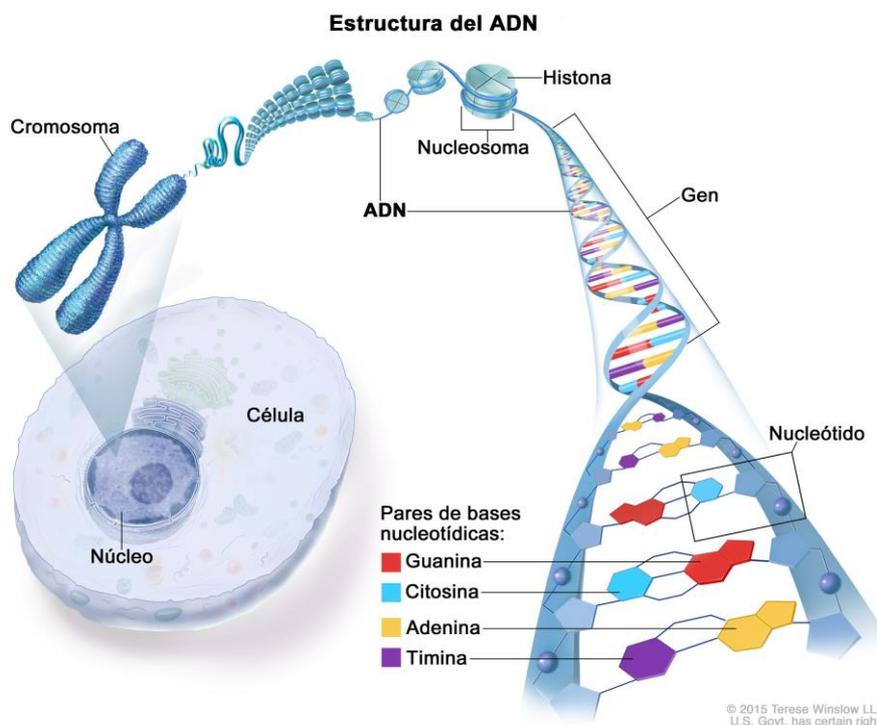
Antes de enumerar su papel como biomarcadores, y para entender su naturaleza y mecanismos de acción, interesa una breve introducción sobre biología molecular básica.

### 1.8.3.5.1 Ácido desoxirribonucleico (DNA). Estructura y función

El DNA es una molécula constituida por una doble cadena formada por uniones covalentes entre nucleótidos, que contienen una molécula de desoxirribosa y una molécula de fosfato. A su vez, cada molécula de desoxirribosa está unida a una de las siguientes bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T).

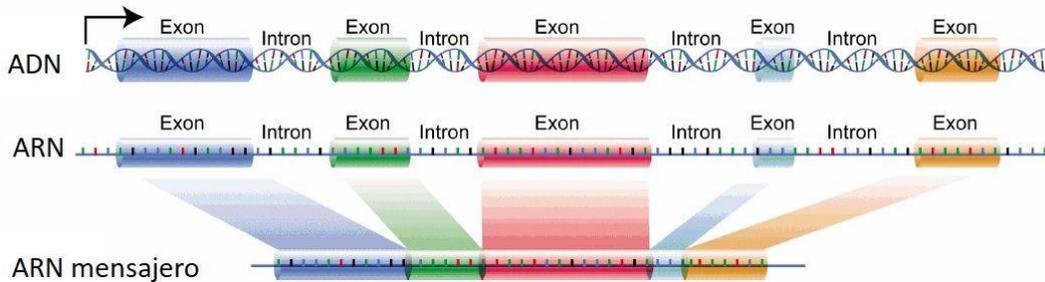
Existe una complementariedad entre las bases nitrogenadas de tal forma que la adenina se une a la timina (A-T) y la guanina a la citosina (G-C) a través de enlaces de puentes de hidrógeno conformando la estructura y estabilidad de la molécula de DNA. Cada una de las dos cadenas complementarias del DNA consta de un extremo 5' constituido por un grupo fosfato y un extremo 3' constituido por un grupo hidroxilo enfrentados entre sí.

El DNA se encuentra organizado en el núcleo de las células en forma de unas estructuras denominadas cromosomas, que almacenan toda la información genética de un individuo. Podemos definir el gen como un segmento de DNA que contiene la información necesaria para fabricar una proteína concreta (Figura 52).



**Figura 52. Estructura del DNA. Cromosomas y genes. Tomado de (414)**

Los genes, a su vez, están formados por tres regiones: los exones, que son los fragmentos que codifican la información que se transcribe a mRNA y se traducirá a proteínas, los intrones que poseen información no codificante (Figura 53) y el promotor, que es la región de DNA proximal a un gen, a la que se unen la RNA polimerasa y factores de transcripción para regular la transcripción de ese gen.



**Figura 53. Estructura del DNA. Cromosomas y genes. Tomado de (415)**

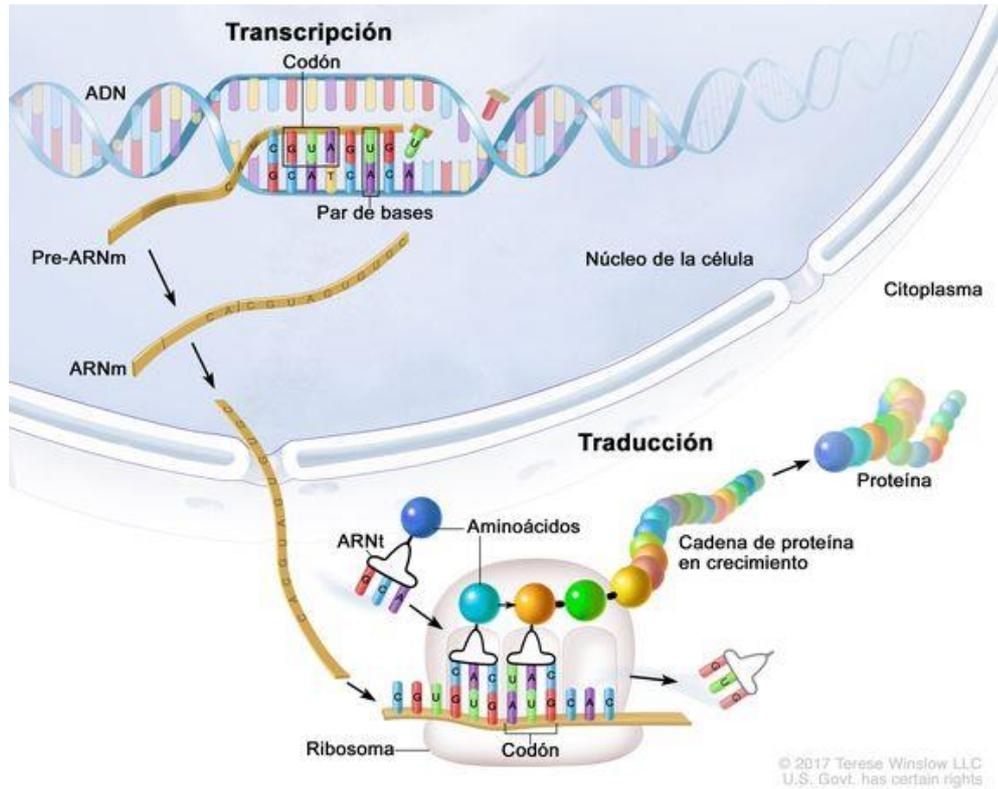
Las alteraciones genómicas del DNA estudiadas como biomarcadores en LARC se han basado generalmente en la presencia de:

- Alteraciones cromosómicas [Inestabilidad (416,417) o aumento de SCNA (418)].
- Metilación del DNA y silenciamiento genómico (419,420).
- Polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (421,422).
- MSI [ver 8.3.4.2 Inestabilidad de microsatélites (dMMR/MSI)].
- Mutaciones en KRAS (ver 8.3.4.2 Mutaciones en KRAS/BRAF).

#### **1.8.3.5.2 Ácido ribonucleico (RNA). Estructura, función y clasificación.**

El RNA es una molécula monocatenaria formado por una sucesión de nucleótidos unidas por grupos fosfato. Los nucleótidos en el RNA están formados por el azúcar ribosa y una de las siguientes bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y uracilo (U). El RNA se sintetiza en el núcleo de la célula a partir de una de las cadenas del DNA, que sirve como molde. Este proceso también es conocido como la transcripción. (Figura 53).

Una de las diferencias con el DNA, es que en el RNA la base nitrogenada complementaria a la adenina es el uracilo en vez de la timina. Existen diferentes tipos de RNA, los más abundantes son el RNA mensajero (mRNA), el RNA de transferencia (tRNA) y el RNA ribosómico (rRNA). Tras la transcripción, el mRNA transmite la información al citoplasma donde, gracias a los ribosomas, se sintetiza la cadena proteica correspondiente, en el proceso denominado traducción (Figura 54).



**Figura 54. Procesos de transcripción y traducción. Tomado de (423)**

Desde el punto de vista funcional, el RNA puede clasificarse en dos grupos (424):

- 1) RNA codificante: codifica información para ser traducida en proteínas. Es el RNA mensajero (mRNA).
- 2) RNA no codificante (ncRNA): su finalidad consiste en mantener y regular la transcripción celular. A su vez se dividen en dos grupos:
  - a. ncRNA de mantenimiento (*housekeeping ncRNA*)  
Se encargan de mantener la integridad del proceso de traducción del RNA. Son esenciales para las actividades celulares. En este grupo ellos se incluyen el RNA ribosómico (rRNA) y el RNA de transferencia (tRNA).
  - b. ncRNA reguladores (*regulatory ncRNA*)  
Son clave en la regulación de la expresión génica a nivel epigenético, transcripcional y post-transcripcional. Según su tamaño distinguimos:

- LncRNA (long non-coding RNA): formados por más de 200 nucleótidos.
- Small ncRNA: formados por menos de 200 nucleótidos. A su vez este grupo está formado por:
  - microRNAs (miRNA)
  - Small interfering RNAs (siRNA)
  - PIWI-interacting RNAs (piRNA)
  - Small nuclear RNAs (snRNA)
  - Small nucleolar RNAs (snoRNA)

A pesar de esta clasificación teórica, hay que tener en cuenta que algunos ncRNA con longitud variable pueden pertenecer a dos clasificaciones al mismo tiempo, como los transcritos asociados a promotores (PAT), los RNAs potenciadores (eRNA) y los RNAs circulares (circRNA), y que los snRNAs y snoRNAs se pueden incluir en ocasiones dentro de los ncRNAs de mantenimiento, por su función.

#### **1.8.3.5.3 Perfiles de expresión génica y transcriptómica como biomarcadores**

En LARC tratado con QRT preoperatoria, se han publicado numerosos estudios exploratorios en la búsqueda y desarrollo de este tipo de biomarcadores.

- Las firmas de expresión génica se han explorado como biomarcadores predictivos a la QRT (393,425–434), con resultados tan interesantes desde el punto de vista científico, como diversos, heterogéneos y poco reproducibles.
- En transcriptómica se han estudiado fundamentalmente en este contexto tres tipos de RNA: mRNA, miRNAs y LncRNA. En el transcriptoma tumoral desordenado, los RNA no codificantes (miRNA y LncRNA) actúan inhibiendo la expresión normal de genes supresores de tumores y/o promoviendo la expresión de oncogenes. Existen estudios que demuestran la utilidad del mRNA (435,436), los miRNAs (437–448) y los LncRNAs (424,449,450) como biomarcadores predictivos de respuesta. Al igual que los perfiles de expresión génica, lamentablemente no han encontrado su aplicación clínica debido a la falta de reproducibilidad y las limitaciones técnicas.

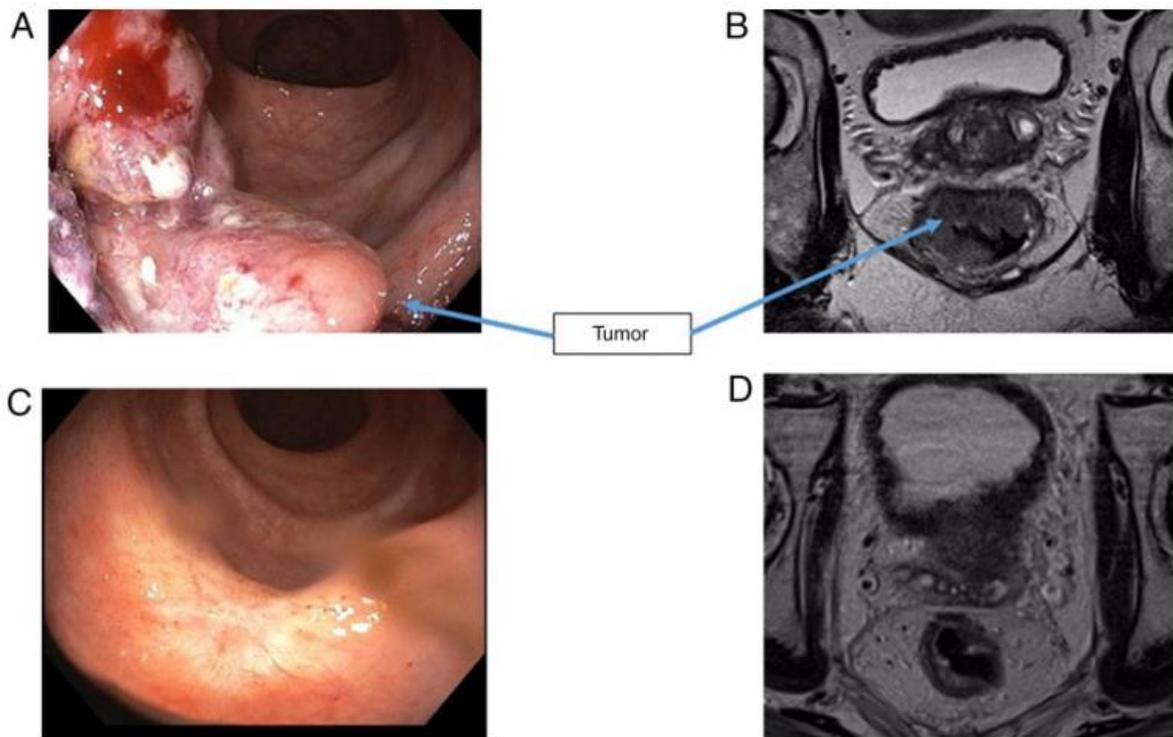
## 1.8.4 Biomarcadores post-QRT neoadyuvante

### 1.8.4.1 Biomarcadores clínicos

- Respuesta clínica completa (cCR)

Aunque es definida como la ausencia de tumor residual detectable tras el tratamiento neoadyuvante, no existe un consenso ampliamente aceptado sobre la definición precisa de la cCR, ya que la mayoría de estudios la definen como la ausencia de tumor detectable al tacto rectal o por endoscopia, mientras que la aportación de los estudios de imagen como RMN y PET han aumentado la capacidad de predecir una pCR que sería la confirmación de una verdadera cCR.

A partir de las 6-8 semanas tras completar la QRT neoadyuvante, puede evaluarse la respuesta clínica mediante técnicas endoscópicas y de imagen (Figura 55). Las tasas de cCR varían en función del tipo de tratamiento neoadyuvante utilizado, y oscilan entre el 11-78% (250). Aquellos pacientes que alcanzan una cCR podrían ser candidatos a una estrategia conservadora (Ver 7.1.9 Estrategia “Watch and wait”)



**Figura 55. Imágenes endoscópicas (A y C) y de RMN (B y D) de un paciente con CR al diagnóstico (A-B) y 10 semanas tras la QRT neoadyuvante (C-D). Tomado de (451)**

## **1.8.4.2 Biomarcadores analíticos**

### **1.8.4.2.1 Marcadores tumorales**

- **Antígeno carcinoembrionario (CEA).**

La reducción de unos niveles elevados de CEA tras la QRT neoadyuvante parecen relacionarse con una tasa de respuestas patológicas y una supervivencia similares a aquellos con niveles de CEA normales al diagnóstico, por lo que algunos autores lo consideran un factor pronóstico independiente (339,452–455). Sin embargo, este beneficio en supervivencia no se ha replicado en todos los estudios (456).

Diferentes estudios también han apuntado que por sí solos, los niveles elevados de CEA tras la cirugía se asocian a una mayor probabilidad de desarrollar metástasis a distancia y a una peor supervivencia (457,458). De hecho, algunos autores apuntan a que la combinación de los niveles de CEA antes y después de la QRT neoadyuvante podría ser una herramienta pronóstica de utilidad, aunque precisa ser validada (459).

- **Antígeno carbohidrato 19.9 (Ca19.9).**

En un estudio de 721 pacientes, la normalización de los niveles de Ca19.9 tras la QRT neoadyuvante demostró mejorar la supervivencia en este grupo frente al de aquellos que no lo habían normalizado, pero sin igualar la supervivencia de aquellos que no tenían niveles elevados de Ca19.9 al diagnóstico inicial (460).

### **1.8.4.2.2 Biopsia líquida**

El concepto de "*biopsia líquida*" hace referencia a la detección de moléculas originadas a partir de tejido tumoral en diferentes fluidos corporales, ya sean células tumorales circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA), microRNA (miRNA) o exosomas (461).

- **DNA tumoral circulante (ctDNA)**

El ctDNA está constituido por fragmentos de DNA derivado de un tumor en el torrente sanguíneo que no está asociado a ninguna célula (462). Entre las aplicaciones potenciales del ctDNA se encuentran el cribado y la detección precoz de procesos tumorales, la estimación del riesgo de recaída, la monitorización de respuesta al tratamiento y la valoración de mecanismos de resistencia (462).

En LARC, la detección de ctDNA tras el tratamiento de QRT neoadyuvante ha demostrado funcionar como biomarcador pronóstico demostrando un mayor riesgo de recaída con independencia de la respuesta patológica obtenida (463,464) y peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (465,466). Como biomarcador predictivo, parece asociarse con el grado de regresión tumoral medido por RMN (467,468). A pesar de estos interesantes resultados, queda por definir cual es el momento ideal para hacer la determinación del ctDNA (antes o después de la neoadyuvancia; o tras la cirugía) y resolver las necesidades técnicas que impiden en el momento actual su uso generalizado.

- **Células tumorales circulantes (CTC)**

Las CTC son células tumorales intactas liberadas por el tumor primario al torrente sanguíneo que contienen RNA, DNA y proteínas de las células tumorales que pueden detectarse analíticamente.

El papel de las CTCs como biomarcador predictivo de respuesta se ha intuído en algunos estudios (469,470) pero sin demostrar capacidad pronóstica. Ni la utilidad clínica ni el valor de las CTC como herramienta complementaria al ctDNA han sido definidas todavía (302).

#### **1.8.4.3 Biomarcadores de imagen**

- **Grado de regresión tumoral por resonancia magnética (mrTRG)**

Existe una manera de evaluar desde el punto de vista radiológico la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Se trata de los sistemas establecidos por el grupo MERCURY (471,472) y por la Sociedad Europea de Radiología Gastrointestinal y Abdominal (ESGAR) (473) que cuantifican el mrTRG (Figura 56).

Ambos sistemas utilizan la intensidad de señal (SI) en la secuencia T2 de la RMN para determinar y diferenciar la proporción de tumor residual de los cambios fibróticos producidos por el tratamiento neoadyuvante. Una vez objetivada la respuesta, el mrTRG se clasifica en cinco (MERCURY) o en tres grupos (ESGAR). Se ha demostrado que el mrTRG es un biomarcador predictivo de respuesta asociado con la pCR (474), y pronóstico para la recidiva local y la supervivencia (471).

Grade	Response	MERCURY (2012)	MERCURY (2016)	ESGAR (2016)
mrTRG 1	Complete response	No evidence of tumor SI or fibrosis only	Linear/crescentic 1-2 mm scar in mucosa or submucosa only	Completely normalized rectal wall
mrTRG 2	Good response	Dense hypointense fibrosis with minimal residual tumor	No obvious residual tumor, signifying minimal residual disease or no tumor	Fibrotic wall thickening without clear mass
mrTRG 3	Moderate response	> 50% fibrosis/mucin and visible tumor with intermediate SI	> 50% fibrosis/mucin and visible tumor with intermediate SI	
mrTRG 4	Slight response	Little areas of fibrosis/mucin, but mostly tumor	Little areas of fibrosis/mucin, but mostly tumor	Residual mass (and/or focal high SI on DWI)
mrTRG 5	No response	Intermediate SI, same appearances as original tumor/tumor regrowth	Intermediate SI, same appearances as original tumor/tumor regrowth	

DWI = diffusion-weighted imaging, ESGAR = European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology,

MERCURY = Magnetic Resonance Imaging and Rectal Cancer European Equivalence Study,

mrTRG = MRI-based tumor regression grade, SI = signal intensity

Figura 56. Sistemas de clasificación del grado de regresión tumoral basado en RMN (mrTRG).

Tomado de (475)

## 1.8.5 Biomarcadores post-QRT neoadyuvante y cirugía

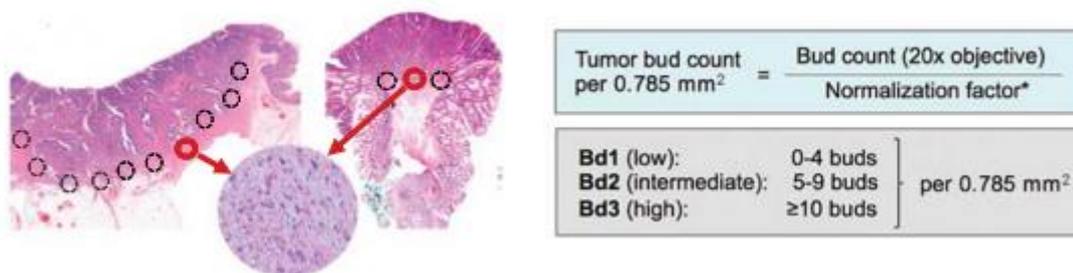
### 1.8.5.1 Biomarcadores anatómo-patológicos

- “**Budding**” tumoral:

El término *budding* se utiliza para describir un conjunto de células tumorales aisladas o en forma de agregados que se desprende de las glándulas tumorales de los adenocarcinomas colorrectales, extendiéndose hacia el estroma adyacente (476).

Para su estandarización, la conferencia de consenso sobre el *budding* tumoral (ITBCC) recomienda cuantificar las yemas (“*buds*”) tumorales sobre áreas seleccionadas de 0,785 mm<sup>2</sup> (objetivo de 20x con un campo ocular de 20mm de diámetro). En función del número de yemas el budding se clasifica en tres categorías (477) (Figuras 57 y 58):

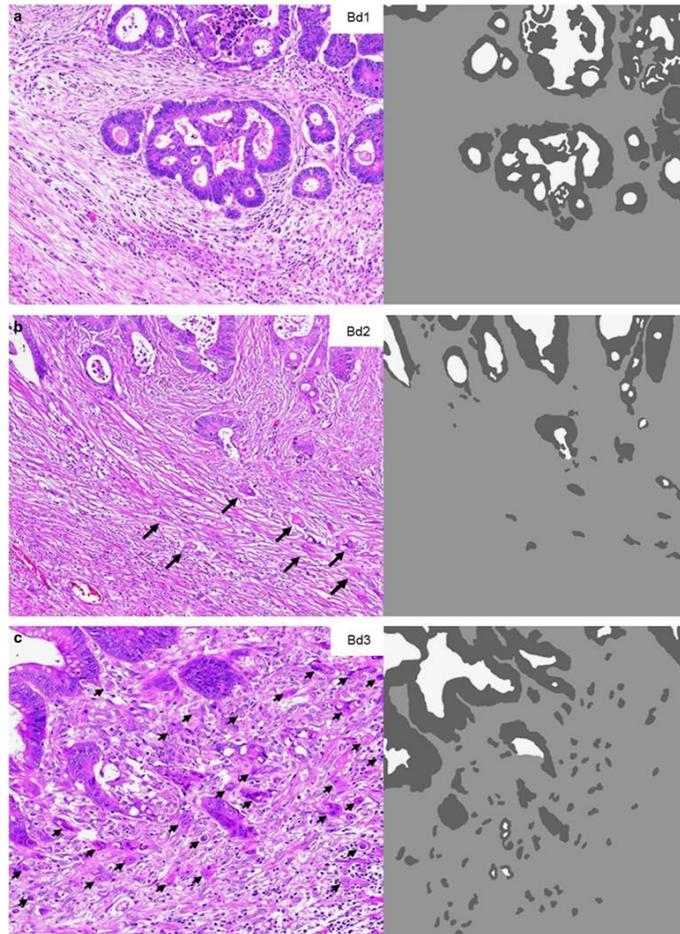
- Bd1 (0-4 yemas): *budding* bajo.
- Bd2 (5 – 9 yemas): *budding* intermedio.
- Bd3 (>10 yemas): *budding* alto.



**Figura 57. Procedimiento propuesto por la ITBCC para informar el budding tumoral en CCR. Tomado de (477)**

El tratamiento con QRT neoadyuvante en LARC induce una reacción inflamatoria sobre los tejidos que también afecta a los grupos celulares que componen el *budding* alterando su morfología (478). Algunos autores clasifican el budding tumoral tras la QRT neoadyuvante en alto (*budding* fácilmente valorable) y bajo grado (*budding* mínimo o aislado apenas valorable) (479).

Un elevado *budding* tumoral ha demostrado ser un biomarcador pronóstico independiente de mal pronóstico tanto en CCR localmente avanzado (480) y metastásico (481), como en LARC tratado con QRT neoadyuvante (482–485).

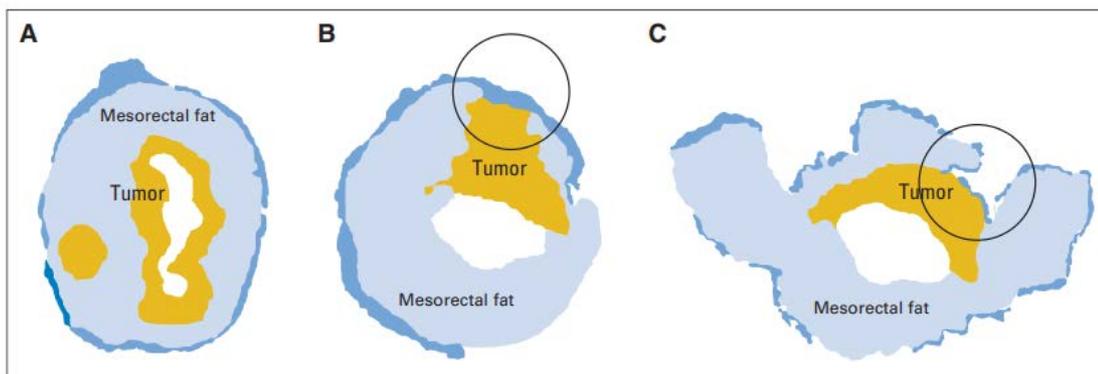


**Figura 58. Sistema de gradación de la ITBCC para el budding tumoral en CCR.**  
**Tomado de (477)**

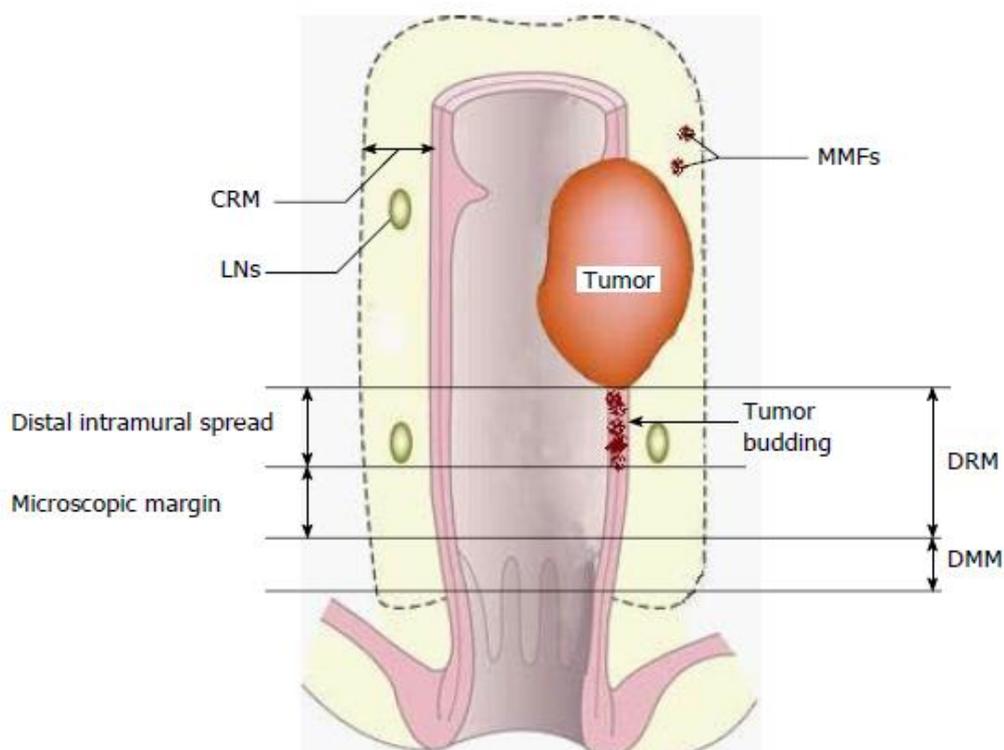
- **Margen de resección circunferencial (MRC)**

También denominado margen de resección radial, lateral o mesorrectal, se define como la distancia entre el tumor rectal y el plano de resección (fascia mesorrectal) objetivado en un corte transversal del recto (Figuras 59 y 60). Una resección completa se define cuando el MRC es mayor de 2 mm (486).

La probabilidad de presentar un MRC afecto (MRC+) aumenta a mayor tamaño tumoral y menor distancia al margen anal (487,488). El MRC+ es un biomarcador de mal pronóstico tras un tratamiento neoadyuvante y cirugía, con un mayor riesgo de recaída a distancia y peor supervivencia (489–493) .



**Figura 59. Representación esquemática del MRC. A) MRC negativo. B) MRC positivo, directamente en el MRC. C) MRC por extirpación incompleta del mesorrecto circundante. Tomado de (489) (477)**



**Figura 60. Esquema de los márgenes de resección en un cáncer de recto y sus relaciones anatómicas. CRM: margen de resección circunferencial; DRM: margen de resección distal. DMM: margen distal mesorrectal; LNs: ganglios linfáticos; MMF: microfocos tumorales mesorrectales. Tomado de (479)**

- **“Downstaging” tumoral**

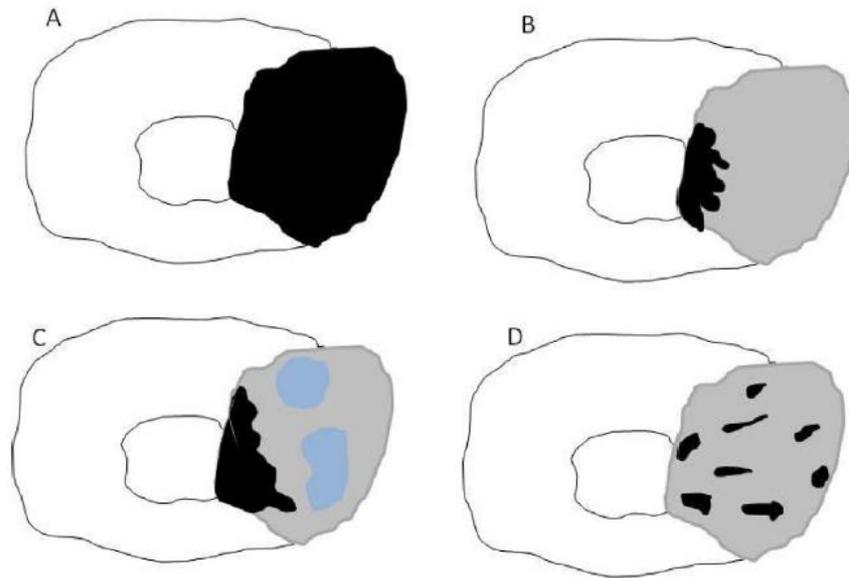
Decimos que existe *downstaging* tumoral cuando al comparar el estadio ypTNM tras la neoadyuvancia y la cirugía [Ver 6.3.1. Estadificación post-quirúrgica (ypTNM)] con el estadio cTNM al diagnóstico [Ver 6.3.1. Estadificación pre-quirúrgica (cTNM)], existe un descenso de categoría a favor del ypTNM (494).

Aunque regresión tumoral y *downstaging* puedan parecer conceptos similares, se ha demostrado en numerosas ocasiones que no siempre la regresión tumoral se acompaña de *downstaging*. La explicación más plausible está en el tipo de respuesta que desarrolla el tumor primario. Se reconocen al menos tres patrones de respuesta al tratamiento neoadyuvante (Figura 61).:

- Reducción: respuesta ideal cuando la contracción se produce en dirección hacia la mucosa. Existe *downstaging*, pero no necesariamente un mejor GRT.
- Fragmentación: desestructuración de la masa tumoral formando pequeños grupos de células tumorales en ocasiones microscópicas y sólo visibles en el estudio histológico. La fragmentación tumoral se ha asociado con mayor probabilidad de afectación ganglionar, menor *downstaging*, pero sí cierto GRT, márgenes de resección positivos y peor pronóstico (495,496).
- Formación de lagos de mucina: existe *downstaging* con un efecto variable en el GRT. Se identifica entre el 12-35% de los pacientes con LARC tratados con neoadyuvancia y hasta en el 27% de los que alcanzan una pCR (494). La aparición de lagos de mucina se ha considerado un biomarcador predictivo de buena respuesta y de buen pronóstico en supervivencia (497–499) aunque otros estudios no lo han validado (500–502). Esta discordancia puede deberse a que algunos estudios no distinguen entre grupos de mucina celulares que parecen conferir mal pronóstico (499) de los acelulares.

El *downstaging* es un biomarcador pronóstico favorable puesto que se asocia con menor tasa de recidivas locales y mejor supervivencia a menor categoría ypTNM alcanzada (200,201).

Aquellos pacientes que presentan afectación ganglionar al diagnóstico (cN+) y que tras el tratamiento neoadyuvante no la presentan en el análisis de la pieza quirúrgica (pN-) tienen mejor pronóstico (503–506).

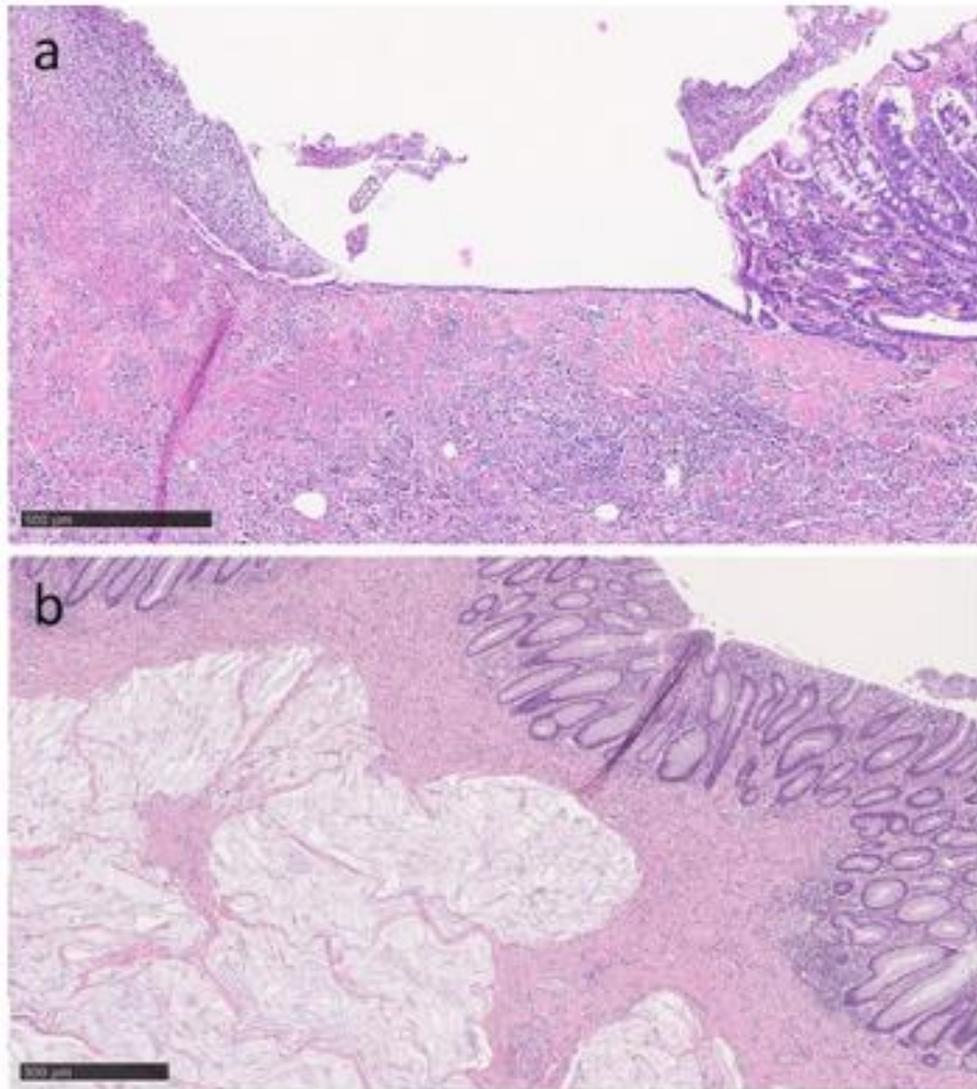


**Figura 59. Representación esquemática de los patrones de respuesta a QRT neoadyuvante de un CR. A) CR (negro); B) Reducción tumoral.; C) Formación de lagos de mucina (azul); D) Fragmentación tumoral. Tomado de (494)**

- **Grado de regresión tumoral (GRT) y respuesta completa patológica (pCR)**

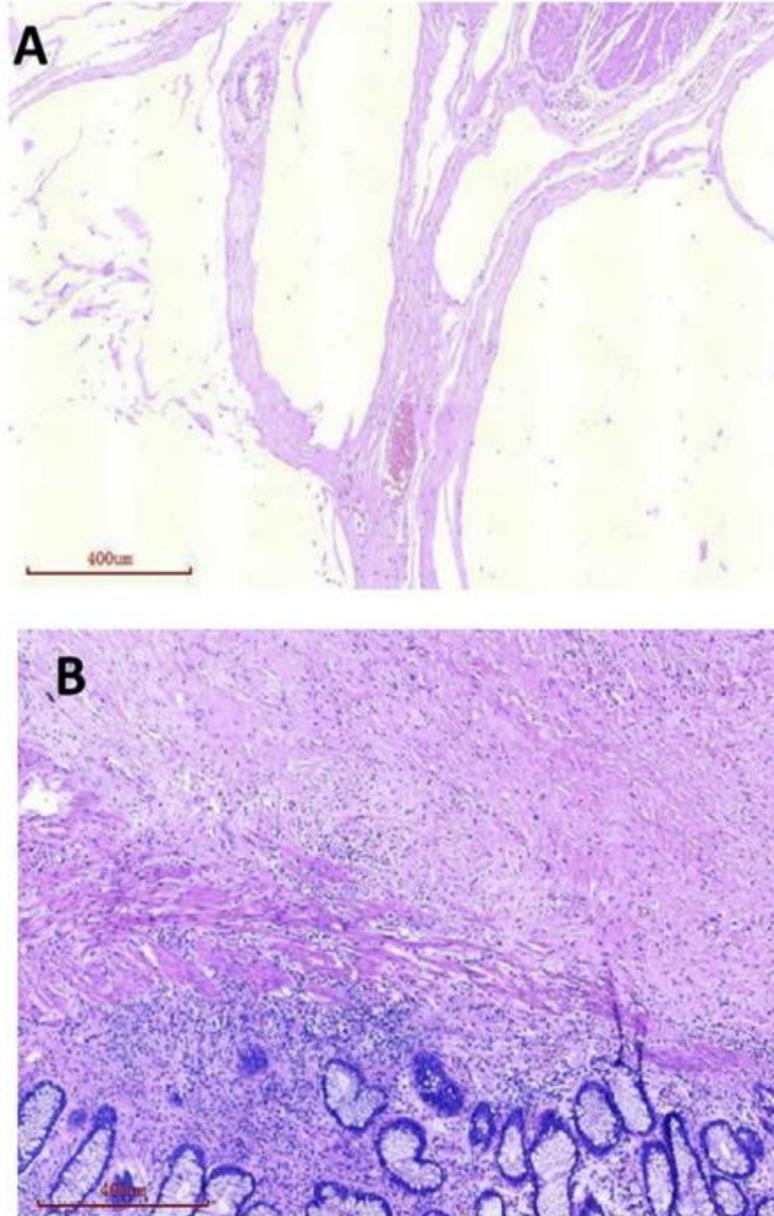
El grado de regresión tumoral se basa en los cambios morfológicos objetivados en la pieza quirúrgica tras el tratamiento neoadyuvante (Ver 6.3.1. Estadificación post-quirúrgica (ypTNM)). Como se ha explicado anteriormente, aunque regresión y *downstaging* son términos relacionados, expresan diferentes conceptos.

Solamente un 40-60% de los pacientes tratados con QRT neoadyuvante alcanzarán un cierto grado de respuesta patológica, de los que solo un 10-30% alcanzará una respuesta completa (pCR) (277,507) (Figura 60). Los sistemas de evaluación del GRT proporcionan una herramienta para analizar de manera más matizada qué pacientes han respondido completamente (pCR), quienes lo han hecho de manera parcial, y quienes no lo han conseguido. El GRT es un biomarcador pronóstico de supervivencia de acuerdo con varios estudios (199–201,508–510), sin embargo no ha demostrado ser un biomarcador predictivo de respuesta a la quimioterapia adyuvante (302).



**Figura 60. Ejemplo de regresión tumoral de un CR operado tras neoadyuvancia. a) Ulceración mucosa, fibrosis e inflamación; b) Mucina acelular. Tomado de (511)**

Mención especial merece la pCR (Figura 61), que ha sido asociada a una menor tasa de recidiva local, a distancia y a una mejor supervivencia tanto libre de enfermedad como global en comparación con aquellos con enfermedad residual tras la cirugía (202,512–516). A pesar de estos datos, un reciente metaanálisis con más de 10.000 pacientes ha concluido que la pCR no puede considerarse un biomarcador subrogado de supervivencia (517).



**Figura 61. Cortes histológicos de dos muestras con pCR. A) Con lagos de mucina acelulares. B) Sin lagos de mucina acelulares. Tomado de (518)**

- **Otros biomarcadores patológicos**

Existen otras características histopatológicas que también han demostrado ser biomarcadores de mal pronóstico de supervivencia tras la QRT neoadyuvante, como el alto grado de diferenciación tumoral, la EMVI y la permeación perineural (519,520). Por otro lado, también se han desarrollado herramientas o nomogramas que en base a diferentes criterios clínico-patológicos pueden comportarse como biomarcadores pronósticos de supervivencia (521,522).



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



## **2. Hipótesis y objetivos.**

### **2.1. Hipótesis**

El tratamiento neoadyuvante del cáncer de recto localmente avanzado (LARC) con quimiorradioterapia (QRT) permite alcanzar en muchos casos un “*downstaging*” tumoral que facilita el abordaje quirúrgico, disminuye la tasa de recidivas locales y aumenta la supervivencia global frente al tratamiento quirúrgico exclusivo. Sin embargo, actualmente no disponemos de herramientas que nos permitan identificar qué pacientes tienen más probabilidades de beneficiarse de esta estrategia de tratamiento y cuáles menos.

Por tanto, nuestra hipótesis plantea que el análisis estadístico de las variables clínicas, analíticas y patológicas, así como el estudio mediante ultrasecuenciación masiva de las biopsias diagnósticas, de los pacientes con LARC podrían permitirnos identificar biomarcadores pronósticos de supervivencia y predictivos de respuesta a la QRT neoadyuvante.

### **2.2. Objetivos**

1. Identificar mediante técnicas de ultrasecuenciación masiva biomarcadores basados en RNA no codificante a partir de las biopsias diagnósticas de una cohorte de pacientes con LARC tratados con QRT neoadyuvante en el Hospital San Pedro de Logroño durante el periodo 2006 – 2012.
2. Desarrollar los vectores de sobreexpresión y silenciamiento de los genes de interés obtenidos en la ultrasecuenciación masiva mediante la tecnología CRISPR/Cas9.
3. Estudiar la influencia de los genes analizados sobre la proliferación celular y la migración en líneas celulares HCT116 mediante la detección de impedancia eléctrica de la célula-sustrato (ECIS).

4. Validar los resultados obtenidos de manera prospectiva en otra cohorte de pacientes con LARC tratados de manera idéntica y en el mismo centro durante el periodo 2012 – 2017.
  
5. Determinar el potencial pronóstico de las variables clínicas, analíticas y patológicas del total de la muestra como biomarcadores pronósticos de recaída de la enfermedad.
  
6. Analizar la capacidad predictiva de las variables clínicas, analíticas y patológicas del total de la muestra en la respuesta a QRT neoadyuvante medida en función del grado de regresión tumoral.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



### **3. Material y métodos**

#### **3.1. Ámbito del estudio**

El análisis objeto de esta tesis se ha realizado en el Hospital San Pedro (HSP) de Logroño y ha contado con la colaboración imprescindible del servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Hospital de Calahorra (FHC) y del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

El HSP es un hospital de segundo nivel perteneciente al Servicio Riojano de Salud (SERIS). El Hospital San Pedro se inauguró en 2007 y cuenta con 630 camas, siendo el hospital de referencia de la Comunidad Autónoma de La Rioja. La FHC es una fundación pública sanitaria creada en 2002 que cuenta con 80 camas y atiende a los municipios de la Rioja Baja agrupados en cuatro cabeceras de comarca: Calahorra, Arnedo, Alfaro y Cervera del Río Alhama.

El CIBIR es un centro de investigación que inició su actividad en el año 2008. Cuenta en la actualidad con 6 áreas estratégicas de investigación: enfermedades infecciosas, resistencia a antibióticos, enfermedades neurodegenerativas, oncología, investigación en cuidados y economía de la salud. Respecto a medios técnicos, el CIBIR cuenta con un animalario con quirófano, microscopio confocal (*Leica*), microscopios de luz e invertidos, sistemas de cultivo celular, citometría de flujo (BD), laboratorio completo de biología celular y molecular, laboratorios de contención con niveles P1, P2 y P3, así como una plataforma de ultrasecuenciación (*Illumina*) y bioinformática.

#### **3.2. Tipo de estudio**

Se trata de un estudio observacional retrospectivo de casos y controles no-EPA (EPA: estudios post-autorización). Este estudio ha sido financiado por un proyecto del instituto de Salud Carlos III (PI13/02166) y por fondos FEDER.

#### **3.3. Diseño del estudio**

El estudio se ha desarrollado en cuatro fases:

- Primera fase (Exploración): se analizaron por ultrasecuenciación masiva las biopsias diagnósticas de dos grupos de pacientes con carcinoma de recto candidatos a QRT preoperatoria.

- Segunda fase (Confirmación): una vez identificados los hipotéticos genes “predictores” y/o “pronósticos”, se realizó en líneas celulares la sobreexpresión y el silenciamiento de los genes en cuestión y se estudiaron sus consecuencias fisiológicas, para determinar el posible papel de esos genes en la carcinogénesis.

Tercera fase (Validación): se aplicó el modelo predictivo/pronóstico a una nueva cohorte de pacientes con carcinoma de recto y características similares a las de la primera fase con el objetivo de validar su aplicabilidad.

- Cuarta fase (Análisis): valoración y análisis estadístico de las variables recogidas en el total de la muestra compuesta por ambas cohortes.

### **3.4. Selección de la muestra**

Se revisaron todos los casos de adenocarcinoma de recto diagnosticados y tratados en el Hospital San Pedro y en el Hospital de Calahorra entre los años 1998 y 2017 de los que se conservaban bloques de parafina en los Departamentos de Anatomía Patológica de ambos Hospitales. Los criterios de inclusión/exclusión y el consentimiento informado fueron similares para el reclutamiento en la primera y tercera fase del estudio.

#### **3.4.1. Criterios de inclusión**

- Confirmación histológica de adenocarcinoma de recto.
- Estadios II y III según la clasificación TNM.
- Indicación de tratamiento neoadyuvante con quimiorradioterapia.
- Tumor resecable o potencialmente resecable tras la QRT neoadyuvante.
- No metástasis a distancia.
- Firma del consentimiento informado en pacientes vivos (Ver Anexo).

#### **3.4.2. Criterios de exclusión**

- Adenocarcinoma de recto localmente avanzado irresecable.
- Contraindicación a recibir quimioterapia con fluoropirimidinas.
- Coexistencia de otras neoplasias activas salvo carcinomas “in situ”.
- Ausencia de diagnóstico histológico.
- Pacientes tratados con radioterapia neoadyuvante sin quimioterapia.

Una vez obtenida su autorización, se incluía en el estudio y se solicitaba al servicio de Anatomía Patológica la muestra de tejido tumoral obtenida previamente al inicio de la neoadyuvancia. La recogida del material se hizo de acuerdo con la legislación vigente (Ley 14/2007 de 3 de julio de Investigación Biomédica) y tras aprobación por el Comité Ético correspondiente (CEICLAR código PI-129. Ver punto 6. Aspectos éticos y legales).

### **3.5. Recogida y análisis de datos**

#### **3.5.1. Definición de variables**

1) Variables demográficas:

- Edad al diagnóstico.
- Fecha de nacimiento (d/m/a).
- Sexo (Hombre/Mujer).
- *Exitus* (Sí/No).
- Fecha *exitus* (d/m/a).
- *Exitus* por otras causas (Sí/No).
- Supervivencia libre de progresión (meses).
- Supervivencia global (meses).

2) Variables relacionadas con el tumor y su tratamiento:

- Fecha diagnóstico histológico (d/m/a).
- Estadio TNM clínico (cTNM).
- Inestabilidad de microsatélites (MSI)(sí/no).
- Mutaciones en KRAS (sí/no).
- Codon mutación KRAS.
- Grado de diferenciación (bien/moderadamente/poco diferenciado).
- Distancia al margen anal (cm).
- Localización tumoral (recto inferior (0-5 cm)/medio (6-10)/superior (11-15)).
- Fumador activo (sí/no).
- Antecedentes de tabaquismo (sí/no).
- Parámetros hematológicos 1ª extracción:
  - o Leucocitos (linfocitos1) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Neutrófilos (neutrófilos1) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Linfocitos (linfocitos1) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Monocitos (monocitos1) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Ratio neutrófilo/monocito (NLR1).
  - o Ratio linfocito/monocitos (LMR1).

- Ratio plaquetas/linfocitos (PLR1).
  - Hemoglobina (Hb1) (g/dL).
  - Plaquetas (Plaquetas1) (c/mm<sup>3</sup>).
- Parámetros bioquímicos 1ª extracción:
    - Glucosa (mg/dL).
    - Urea (mg/dL).
    - Creatinina (mg/dL).
    - Ácido úrico (mg/dL).
    - Sodio (mg/dL).
    - Potasio (mg/dL).
    - Triglicéridos (mg/dL).
    - Colesterol total (mg/dL).
    - HDL-Colesterol (mg/dL).
    - LDL-Colesterol (mg/dL).
    - Lactato deshidrogenasa (U/L).
    - GOT/AST (U/L).
    - GPT/ALT (U/L).
    - Gamma glutaril transferasa (U/L).
    - Bilirrubina total (mg/dL).
    - Fosfatasa alcalina (U/L).
    - Ferritina (mcg/L).
    - Hierro (mcg/L).
    - Calcio (mg/dL).
    - Proteínas totales (mg/dL).
    - Albúmina (mg/dL).
    - Ca19.9 (UI/L).
    - CEA (ng/mL).
- Quimioterapia utilizada en la neoadyuvancia (capecitabina/5-fluorouracilo).
  - Fecha de inicio de la QRT neoadyuvante (d/m/a).
  - Tiempo desde la fecha diagnóstica al inicio de la QRT (días).
  - Fecha del fin de la QRT (d/m/a).
  - Tiempo desde el fin de la QRT a la cirugía (días).
  - Fecha de la cirugía (d/m/a).
  - Tiempo desde la fecha diagnóstica a la fecha de la cirugía (días).

- Parámetros hematológicos 2ª extracción:
  - o Leucocitos (linfocitos2) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Neutrófilos (neutrófilos2) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Linfocitos (linfocitos2) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Monocitos (monocitos2) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Ratio neutrófilo/monocito (NLR2).
  - o Ratio linfocito/monocitos (LMR2).
  - o Ratio plaquetas/linfocitos (PLR2).
  - o Hemoglobina (Hb2) (g/dL).
  - o Plaquetas (plaquetas2) (c/mm<sup>3</sup>).
  
- Tipo de cirugía (Amputación abdomino-perineal/No amputación).
- Características patológicas de la pieza quirúrgica:
  - o Estadío TNM patológico tras neoadyuvancia (ypTNM).
  - o Grado de regresión tumoral (GRT) (sistema CAP/AJCC: 0/1/2/3).
  - o Perforación (sí/no).
  - o Invasión vascular extramural (EMVI) (sí/no).
  - o Invasión linfática (sí/no).
  - o Invasión perineural (sí/no).
  - o Afectación ganglionar (sí/no).
  - o Número de ganglios con infiltración tumoral (numero).
  - o Número de ganglios resecaos tras la cirugía (número).
  
- Quimioterapia (QT) adyuvante tras la cirugía (sí/no).
- Esquema de QT adyuvante (capecitabina/5-fluorouracilo/FOLFOX).
- Parámetros hematológicos 3ª extracción:
  - o Leucocitos (linfocitos3) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Neutrófilos (neutrófilos3) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Linfocitos (linfocitos3) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Monocitos (monocitos3) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Ratio neutrófilo/monocito (NLR3).
  - o Ratio linfocito/monocitos (LMR3).
  - o Ratio plaquetas/linfocitos (PLR3).
  - o Hemoglobina (Hb3) (g/dL).
  - o Plaquetas (plaquetas3) (c/mm<sup>3</sup>).

- Fecha de inicio de la QT adyuvante (d/m/a).
- Tiempo desde la fecha de la cirugía al inicio de la QT adyuvante (días).
- Fecha del fin de la QT adyuvante (d/m/a).
- Parámetros hematológicos 4ª extracción:
  - o Leucocitos (linfocitos4) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Neutrófilos (neutrófilos4) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Linfocitos (linfocitos4) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Monocitos (monocitos4) (c/mm<sup>3</sup>).
  - o Ratio neutrófilo/monocito (NLR4).
  - o Ratio linfocito/monocitos (LMR4).
  - o Ratio plaquetas/linfocitos (PLR4).
  - o Hemoglobina (Hb4) (g/dL).
  - o Plaquetas (plaquetas4) (c/mm<sup>3</sup>).
- Fecha de progresión (d/m/a).
- Fecha de seguimiento desde el fin de la QRT hasta 5 años máximo (d/m/a).
- Fecha última visita médica (d/m/a).

### **3.5.2. Recogida y selección de material clínico**

A lo largo de todo el proceso, se realizó la preselección de los pacientes que cumplen los criterios de inclusión atendidos en el Hospital San Pedro y en el Hospital de Calahorra entre los años 1998 y 2017. Tras la firma del consentimiento informado, se solicitaron los bloques de parafina de las biopsias diagnósticas conservadas en los departamentos de Anatomía Patológica de ambos Hospitales. Posteriormente, se identificaron las zonas de tejido teñido con hematoxilina/eosina con áreas ricas en células tumorales y se marcaron para su posterior corte y extracción.

Dado el riesgo de perder toda la muestra diagnóstica en nuestro análisis y ante las futuras implicaciones terapéuticas, se decidió determinar la MSI y las mutaciones en RAS/BRAF en la biopsia inicial a menos que existiera muestra suficiente en la pieza quirúrgica, en cuyo caso se determinarían en dicho tejido. Este análisis se realizó en el departamento de Anatomía Patológica y en el laboratorio de genética del hospital San Pedro (con la colaboración de la Dra. Susana Rubio y el Dr. Fernando Iguaz).

### **3.5.3. Primera fase o fase de exploración**

Esta primera fase se realizó en el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja.

### **3.5.3.1. Extracción de RNA y transcripción inversa**

Tras procesar el material obtenido, se realizaron uno o dos cortes de 4 µm cada uno de las áreas seleccionadas de los bloques de parafina en condiciones libres de RNAsas. A partir de estos cortes se purificó el RNA utilizando el High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche). La calidad del RNA se analizó con el sistema de electroforesis automático Experion (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) y el RNA que pasó los controles de calidad fue sometido a transcripción inversa utilizando los kits específicos de la casa Illumina.

### **3.5.3.2. Ultrasecuenciación, análisis de datos y vías implicadas**

Posteriormente, el cDNA obtenido fue sometido a NGS (*Next Generation Sequencing*) utilizando los protocolos de Illumina y la plataforma *Genome Analyzer IIx* (Illumina), según protocolos publicados por nuestro Grupo (523):

- La segunda hebra de cDNA se obtuvo utilizando DNA polimerasa y RNasa H. Los fragmentos de cDNA se repararon en los extremos mediante DNA polimerasa de Klenow y DNA polimerasa T4. A continuación el cDNA fue fosforilado por polinucleótido quinasa T4 y adaptadores de indexación ligados (Illumina, Madrid, España).
- Las bibliotecas de genes etiquetadas con adaptador se amplificaron mediante PCR con DNA polimerasa (Phusion; Finnzymes Reagents, VAtaa, Finlandia) y se validaron y cuantificaron mediante electroforesis y qPCR. Se mezclaron conjuntos de 4-6 bibliotecas indexadas en proporciones equimolares para producir una concentración de mezcla de oligonucleótidos total de 10nM.
- Las bibliotecas finales se secuenciaron en una plataforma HiSeq 1500 (Illumina, Madrid, España) para generar lecturas de extremos emparejados de 2x125p.

### **3.5.3.3. Análisis bioinformático**

Los datos obtenidos fueron analizados con protocolos de False Discovery Rate (FDR) para identificar aquellos genes cuya expresión varía significativamente en relación con criterios clínicos relevantes tales como: supervivencia global o libre de enfermedad a los 5 años, tasa de respuesta completa patológica, o toxicidad a la QRT. También se analizaron las vías de señalización intracelular más implicadas en esta respuesta. Todos estos procedimientos han sido publicados por nuestro Grupo (524).

### 3.5.3.4. Comprobación de resultados mediante RT-PCR

Para corroborar los resultados obtenidos mediante ultrasecuenciación, los cDNA originales fueron sometidos a PCR a tiempo real (RT-PCR) con *primers* específicos para aquellos genes con valor de candidatos a biomarcadores. En nuestro caso, para el gen de LINC01344 se eligieron los primers de los exones 1 y 3 mientras que para EDEM3 se seleccionaron primers en los exones 2 y 3 (Tabla 15 y Figs. 62 y 63).

<b>Tabla 15. Primers seleccionados para la realización de la qRT-PCR con los genes EDEM3 y LINC01344. En negrita se marcan las secuencias seleccionadas</b>	
	<i>Sequence 5´-3´</i>
h-LncRNAex1-F	AATTGGTTGCATGGTTTCTCT
h-LncRNA ex1-r	CCCAAGGCATCATCAACGTC
<b>h-LncRNA ex3-F</b>	<b>TTCTACACTTGCTCTGGCGG</b>
<b>h-LncRNA ex3-r</b>	<b>GCCCTTCCCATGTCTCCATC</b>
h-Edem3-exons	CCGAGCCCATGAGTAGGGA
h-Edem3-exons	CCCAAGGCATCATCAACGTC
<b>h-Edem3-ex2 (OL4)-F</b>	<b>GAGGAGAAACAGAAGCTTGGGA</b>
<b>h-Edem3-ex2 (OL4)-R</b>	<b>TGGCCTCTAACTCGACCTCT</b>
h-Edem3-ex3-(OL2)-F	TGCTTACCCTGCTGATGAAT
h-Edem3-ex3-(OL2)-R	GCATCATCAACGTCACCGC

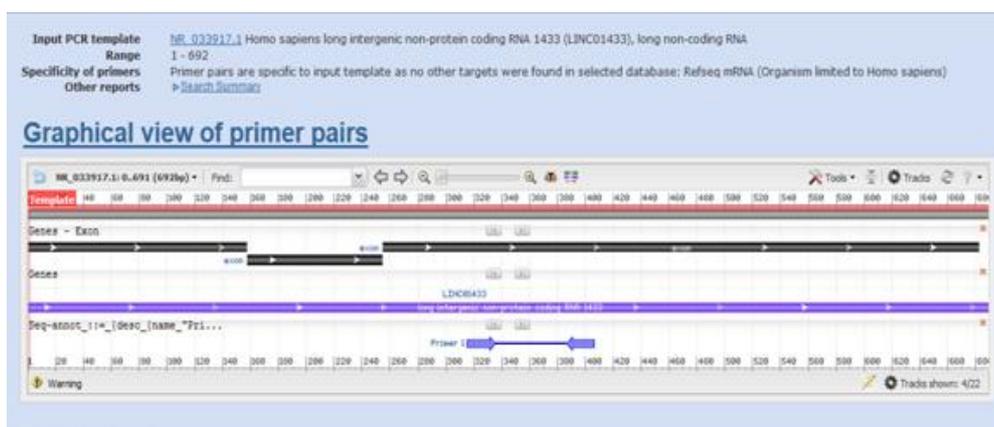
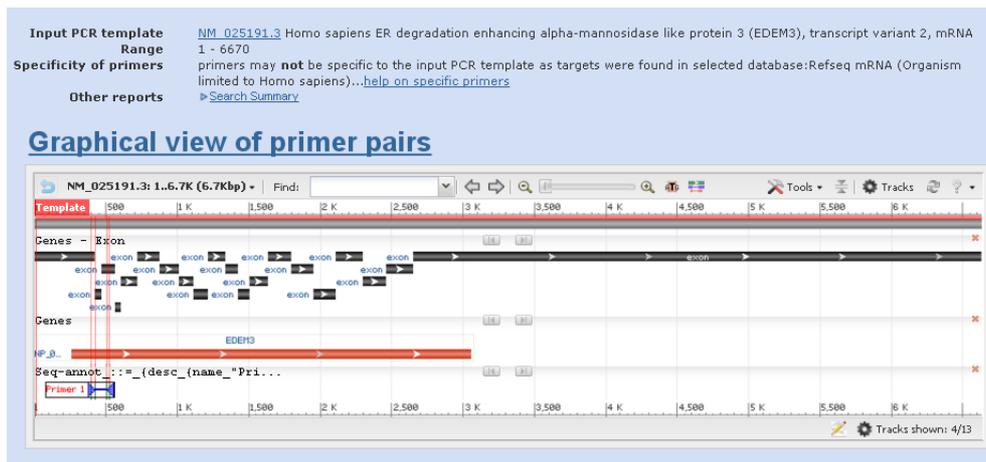


Figura 62. Primers para LINC01344 del exón 3 (BLAST-NCBI).



**Figura 63. Primers para EDEM3 en el exón 2.**

### 3.5.4. Segunda fase o fase de confirmación

La segunda fase también se realizó en el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja con el objetivo de evaluar el efecto de los genes identificados en la primera fase sobre la proliferación celular y la migración en el desarrollo tumoral. Este análisis fue objeto de un trabajo de fin de Máster en el Máster en Química y Biotecnología de la Universidad de La Rioja durante el año académico 2016/2017, presentado por Dña. M<sup>a</sup> Diana Ezquerro Pérez.

#### 3.5.4.1. Cultivo celular

Para el estudio de los genes identificados y su función en líneas celulares, elegimos la línea celular de cáncer colorrectal HCT-116 (525) obtenida de un varón de 48 años y portadora de la mutación KRAS en el codón 13 (p.G13D) (526). Dicha línea se adquirió de la colección americana de líneas celulares (*American Type Culture Collection - ATCC*) con el código CCL-247 (527).

Las células HCT116 se mantuvieron en el medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, ThermoFisher Scientific*) suplementado con *Glutamax* con adición de un 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de estreptomicina/penicilina (*Gibco*). En este medio, la línea celular HCT-116 fue mantenida a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub> formando una monocapa.

Las células fueron tripsinizadas cada 3-4 días y su número fue estimado con el contador automático TC20™ (BIO-RAD) para cuantificar la cantidad de células viables. Las células se sembraron o se utilizaron para los distintos ensayos programados. Para la transfección se utilizó DMEM carente de suero y antibióticos. Una vez que las células

fueron transfectadas, se utilizó DMEM-*Glutamax* con 10% de FBS y el antibiótico correspondiente según el vector de transcripción de cada clon.

### 3.5.4.2. Construcción de vectores

Inicialmente, desarrollamos en el laboratorio los diseños de clonación y la organización de los genes. Su síntesis posterior fue llevada a cabo por el servicio de síntesis de genes de la compañía GenScript (528). La compañía envió unos 4 µg de plásmido liofilizado que fue rehidratado para su posterior amplificación en bacterias.

#### 3.5.4.2.1. Vectores de sobreexpresión de EDEM3 y LINC01344

Se construyeron dos vectores de sobreexpresión para los genes de interés, que en nuestro estudio fueron EDEM3 y LINC01344. También se generaron los plásmidos vacíos para su uso como control. En ambos casos se usó el vector pcDNA 3.1 (Invitrogen), comúnmente utilizado en células de mamíferos (Figura 64).

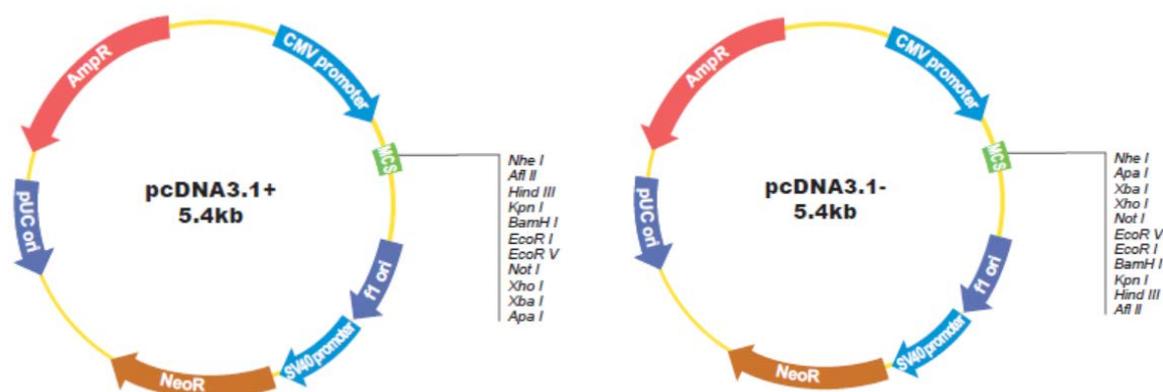


Figura 64. Vector pcDNA3.1 (+)/pcDNA3.1 (-). Tomado de (529).

Para el vector que contiene EDEM3 se introdujo en un vector pcDNA3.1, pero que en este caso no presenta el gen de la proteína GFP. El gen de interés se insertó tras el promotor constitutivo CMV en la región del *polylinker* (Figura 65). Este plásmido contiene un gen de resistencia a higromicina para la selección de los transfectantes.

El gen LINC01344 se usó un vector pcDNA 3.1 modificado, ya que se incluyó el gen reportero GFP (proteína verde fluorescente) bajo el control del promotor constitutivo CMV (Figura 66). La expresión de esta proteína permite el seguimiento de la correcta transfección por la adquisición de fluorescencia verde.

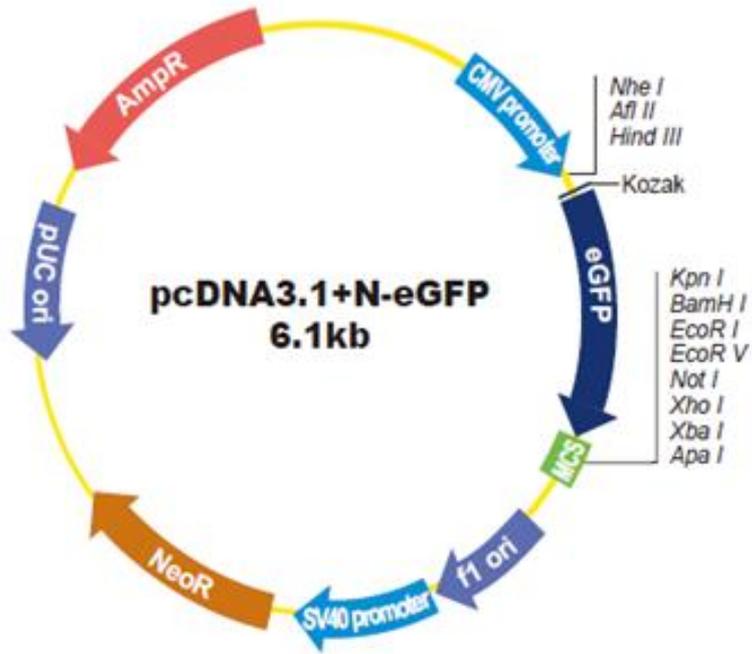


Figura 65. Vector pcDNA3.1 (+) con la inserción del gen LncRNA (528)

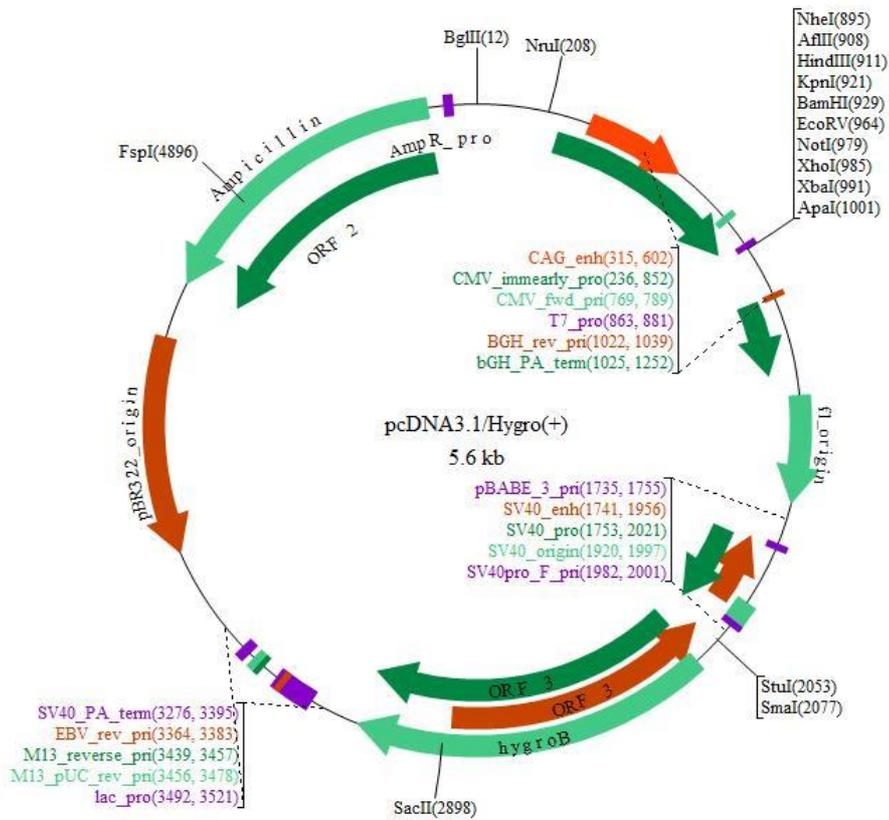
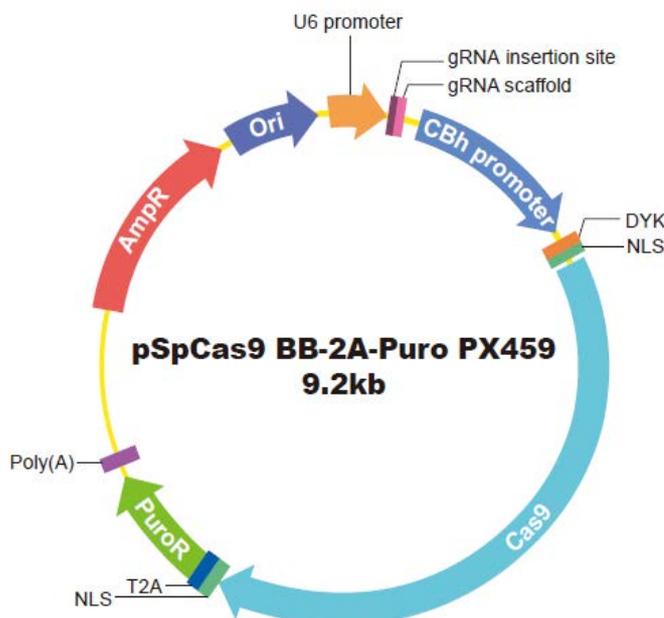


Figura 66. Vector pcDNA3.1 (+) con la inserción del gen EDEM3

### 3.5.4.2.2. Vectores de silenciamiento de EDEM3 y LINC01344

El vector que usamos para el clonaje de las secuencias guía (gRNA) fue suministrado por la compañía GenScript (528) (Figura 67).



**Figura 67. Esquema del vector para el clonaje de las secuencias guías de los genes en estudio.**

Para poder seleccionar tanto el gen EDEM3 como el LncRNA01443 se usó la resistencia que los plásmidos presentan a la puromicina a la concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Estos plásmidos también contienen la resistencia a la ampicilina para poder realizar la selección y amplificación en la transformación de bacterias. Estos vectores contienen a la vez tanto la actividad endonucleasa de Cas9, como las secuencias guía para el reconocimiento de los genes a silenciar. Utilizamos dos secuencias guía para cada uno de los dos genes estudiados, pero en ningún caso se utilizaron de manera combinada en la transfección. Las secuencias diana para el corte por CRISPR/CAS9 se seleccionaron entre las que nos suministró la casa comercial en función de su localización (Tabla 16).

Con esta información se seleccionaron las secuencias guía 2 y 4 para EDEM3 (exón 3 y 2) y las secuencias guía 2 y 3 (exón 3 y 1) para el gen LINC01344 (Figura 68).

<b>Tabla 16. Secuencias guía de reconocimiento para el CRISPR ( suministrado por GeneScript).</b>	
EDEM3 CRISPR Guide RNA 1	TCATCAACGTCACCGCGACT
EDEM3 CRISPR Guide RNA 2	TCTGACACTGATTGATTCTT
EDEM3 CRISPR Guide RNA 4	TCATGCTTATGGTAACTATA
EDEM3 CRISPR Guide RNA 5	GAAACAAACATCAGAGTTCT
EDEM3 CRISPR Guide RNA 6	TAAAATTAGGAATCAAGTAC
lncRNA CRISPR Guide RNA 1	TGCACTAGCGGTTGTTGGTG
lncRNA CRISPR Guide RNA 2	TGTCATGCACTAGCGGTTGT
lncRNA CRISPR Guide RNA 3	TGCATGGTTTCTCGTGCTGT

### **3.5.4.3. Transformación de *E. Coli* y selección de colonias con los plásmidos.**

Se transformaron las bacterias *Escherichia coli* One Shot® TOP10 (*Life Technologies-Invitrogene*) con los plásmidos para su amplificación. La selección de las bacterias transformadas se realizó a partir de la resistencia a ampicilina que se incluye en los vectores, utilizando una concentración de 100 µg/ml.

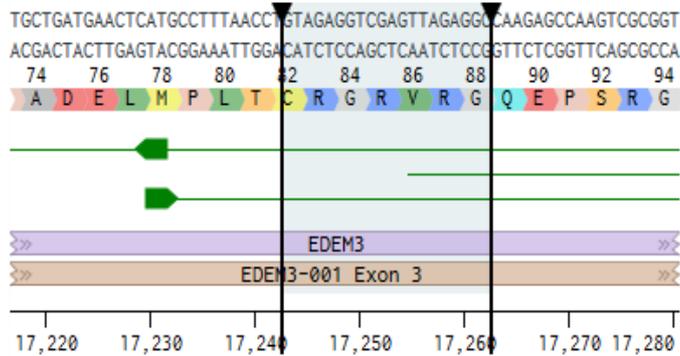
Las colonias resistentes se picaron individualmente y se pusieron a crecer en medio LB líquido hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600nm de 2,0. Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico de cada colonia. Esto se realizó con todos los plásmidos, tanto con los vectores de sobreexpresión como con los de silenciamiento.

#### **3.5.4.3.1. Eliminación del gen *LncRNA01433* del vector *pcDNA3.1-eGFP***

Como ya se ha mencionado, el plásmido pcDNA3.1-eGFP se modificó para incluir el gen LINC01344 por lo que no disponíamos del vector sin el gen que nos sirviese de control. Para ello se eliminó el fragmento del gen mediante enzimas de restricción y ligación posterior. Se utilizó el enzima de restricción *EcoRI* para eliminar el inserto con el gen. Tras el corte se procedió a la ligación de los extremos cohesivos con la ligasa DNA T4 (*Invitrogen*). Tras la obtención de colonias individuales, se purificaron los plásmidos y se comprobó mediante enzimas de restricción la eliminación del gen LINC01344. Se realizaron diferentes cortes con los enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* y se comprobaron los fragmentos generados analizándose en un gel de agarosa al 0,8%.

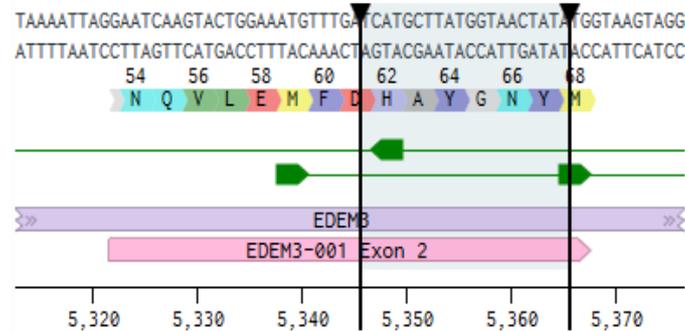
### **EDEM3 CRISPR Guide RNA 2:**

**GCCTCTAACTCGACCTCTAC**



### **EDEM3 CRISPR Guide RNA 4:**

**TCATGCTTATGGTAACTATA**



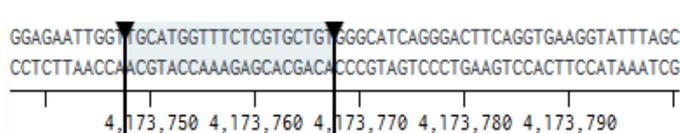
### **LncRNA CRISPR Guide RNA 2:**

**TGTCATGCACTAGCGGTTGT**



### **LncRNA CRISPR Guide RNA 3:**

**TGCATGGTTTCTCGTGCTGT**



**Figura 68. Localización de las secuencias guía.**

**A.- EDEM3-guía 2,B.-EDEM3 guía 4, C.-LINC01344 guía 2, D.- LINC01344 guía 3**

#### **3.5.4.4. Extracción de DNA plasmídico**

La extracción del DNA plasmídico se realizó según el protocolo de *miniprep* utilizando un kit comercial (*NucleoSpin Palsmid EasyPure*, Macherey-Nagel) (530).

#### **3.5.4.5. Transfección celular**

Se realizó la transfección de las células HCT-116 con los vectores tanto de sobreexpresión como de silenciamiento. Se usó el Kit de transfección BQC trans (BioQuoChem, ref. KT05003) (531). Tras 12 horas de la transfección, cambiamos a medio DMEM con FBS y con los antibióticos de selección. Se comprobó la transfección con microscopio invertido de fluorescencia Leica CRT4000 a través del plásmido que contiene el gen reportero GFP. Para los plásmidos sin GFP observamos por microscopía óptica la muerte progresiva de las células que no habían sido transfectadas y que por tanto no tenían el gen de resistencia a los antibióticos: higromicina para los vectores de EDEM3 y puromicina para los vectores de CRISPR

#### **3.5.4.6. Extracción de RNAs**

Se recogieron las células de placas p100 con Trizol para la posterior extracción del RNA. La purificación del RNA se hizo con el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Una vez extraído el RNA, se midió su pureza y cantidad con el *Nanodrop*.

#### **3.5.4.7. qRT-PCR**

Para analizar la expresión del RNA de nuestros genes utilizamos la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real después de la retrotranscripción (qRT-PCR). A partir del RNA extraído con anterioridad, realizamos la retrotranscripción a cDNA con el Kit *SuperScript® III* de *Life technologies*, para a continuación hacer la PCR a tiempo real. Utilizamos la qRT-PCR para medir cuantitativamente la amplificación de DNA utilizando señales fluorescentes.

En nuestro caso utilizamos la *SYBRGreen*, que emite fluorescencia cuando se asocia al DNA interaccionando con el surco menor de la doble cadena. El resultado es un aumento de la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto de PCR producido. En cada ciclo de PCR se mide la fluorescencia emitida hasta que se completan todos los ciclos, que son alrededor de 40. La curva generada tiene un valor característico que es el CTt (cycle threshold), de forma que los valores bajos del CTt se corresponden con una expresión elevada del gen.

Se debe realizar una recta patrón con diferentes concentraciones del producto que vamos a analizar para poder realizar la cuantificación absoluta (532). Para nuestro estudio se pusieron por duplicado todas las muestras, poniendo en cada reacción los *primers* del gen que queríamos analizar. Para el gen de LINC01344 se eligieron los *primers* de los exones 1 y 3 mientras que para EDEM3 se seleccionaron *primers* en los exones 2 y 3. En cada pocillo se puso un volumen total de 25  $\mu$ l, con 0.5  $\mu$ l de cada primer (“*Forward*” y “*Reverse*”) y con 2  $\mu$ l del cDNA por muestra. Realizamos una PCR con 40 ciclos.

#### **3.5.4.7.1. Selección de oligonucleótidos para qRT-PCR**

Se utilizó la herramienta *Primer-BLAST* del NCBI para la búsqueda y diseño de los oligonucleótidos a usar en la PCR cuantitativa (Tabla 15). La selección se realizó atendiendo a la temperatura de hibridación, su contenido de CG, la auto-complementariedad y la complementariedad con el otro oligonucleótido de la reacción. Todas las combinaciones de oligonucleótidos diseñados generan las amplificaciones esperadas. Las figuras muestran imágenes representativas de las regiones que se amplifican con algunos de los oligonucleótidos diseñados.

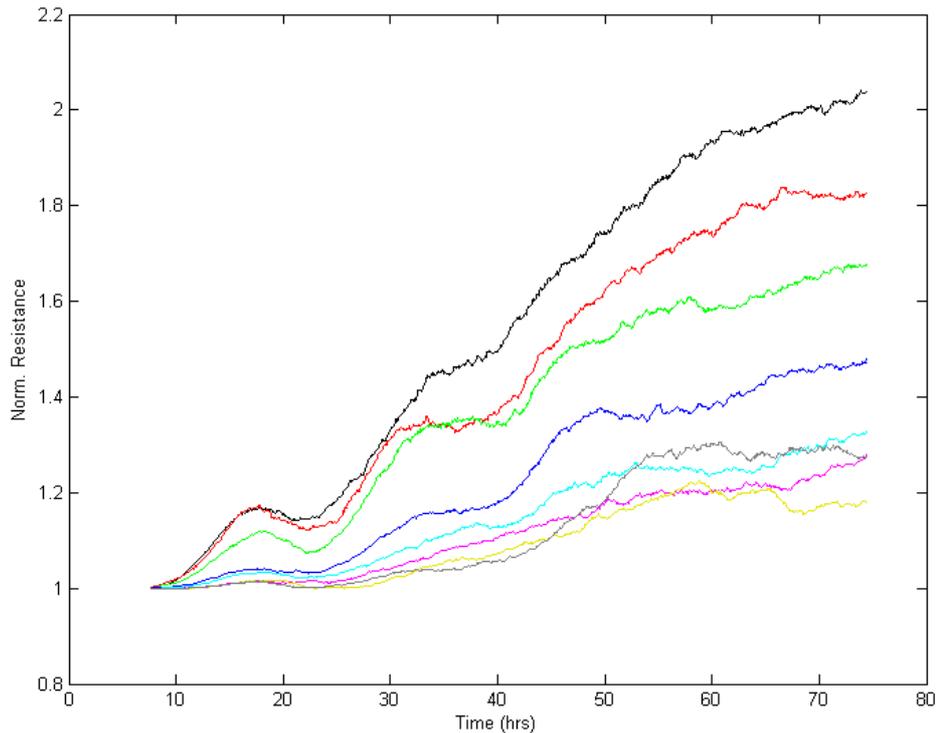
#### **3.5.4.8. Proliferación celular**

##### **3.5.4.8.1. Ensayo por ECIS**

Para la realización de este ensayo se utilizó el sistema electrónico ECIS ZTheta (Applied Biophysics). Las células se sembraron en cámaras especiales de 8 pocillos que presentan en su cara inferior electrodos sensores. La resistencia al paso de la corriente es un indicativo de la cobertura celular del electrodo.

Se realizó un ensayo previo con la línea celular HCT-116 (Figura 69) usando diferentes números de células a la hora de sembrar en los pocillos, 2.500, 5.000, 7.500, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000 y 50.000 células, para determinar la cantidad necesaria de células con la que realizar los ensayos. Tras este estudio preliminar se consideró que 50.000 células por pocillo era el número idóneo para el estudio de los parámetros funcionales que se pretenden estudiar en la línea HCT116.

Tras 3-4 días de recogida de datos las células se sometieron a un pulso eléctrico de alta intensidad que eliminó aquellas presentes sobre el electrodo. El incremento en la resistencia tras el pulso es un indicativo de la capacidad de repoblar la zona del electrodo desde las zonas anexas, y por tanto de la capacidad migratoria de las células



**Figura 69. Ensayo de proliferación por ECIS de la línea celular HCT-116. Efecto según el número de células.**

#### 3.5.4.8.2. Ensayos de proliferación por MTT

Para medir la proliferación por este método se dispusieron 50.000 células en placas de 24 pocillos y de 8.000 y 4.000 células respectivamente en placas de 96 pocillos donde se mantuvieron durante 48h. Se utilizó el reactivo MTS (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) asociado a un reactivo de acoplamiento (feniazina etosulfato) (Promega). Los ensayos fueron realizados por lo menos por duplicado, y se realizaron las medidas a 2 y 4 horas.

#### 3.5.5. Tercera fase o fase de validación

Tras identificar los genes que podrían utilizarse como potenciales biomarcadores y confirmar su mecanismo de acción a nivel celular en la carcinogénesis tumoral, se utilizaron (previa firma del consentimiento informado) las muestras de una nueva cohorte de pacientes con características similares a la cohorte inicial para validar los resultados del primer análisis utilizando la misma técnica de NGS.

### **3.5.6. Cuarta fase o fase de análisis**

Las características de todos los pacientes que participaron en el estudio (tanto los de la primera como los de la tercera fase) se describieron mediante medias y desviaciones estándar, medianas y rangos intercuartílicos, o frecuencias y porcentajes, según la normalidad y naturaleza de las variables.

Los pacientes se clasificaron según la recurrencia y el grado de regresión tumoral para realizar comparaciones entre grupos mediante pruebas de comparación para muestras independientes como la t de Student, la U de Mann-Whitney, la Chi cuadrado o la prueba de Fisher. También se utilizó el modelo de regresión logística para estudiar la influencia de las diferentes variables en la recaída y respuesta, y se utilizaron curvas ROC para intentar definir un modelo predictivo y pronóstico.

Se utilizó el método de Kaplan-Meier para el análisis de la SG y la supervivencia libre de recaídas (SSE) y el log-rank test y el modelo de riesgos proporcionales de Cox para comparar la supervivencia entre grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para una prueba de dos colas cuando  $p < 0,05$ . Se utilizó la versión 20.0 de SPSS Inc., Chicago, IL para todos los análisis estadísticos.

### **3.6. Aspectos éticos y legales**

Antes de su inclusión, los pacientes fueron informados detalladamente del estudio y sus objetivos, entregándoles una hoja de información complementaria (Anexo 1). Cada paciente vivo firmó un documento de consentimiento informado donde se explicitaba el tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos y la obtención, almacenamiento y custodia de las muestras según la legislación vigente (Anexo 2). El consentimiento podía ser revocado en cualquier momento.

La memoria de este proyecto fue aprobada por el comité de ética de investigación clínica de La Rioja (CEICLAR) con la referencia CEICLAR-129 aprobada el 30 de julio de 2013 (Anexo 3). Posteriormente, se realizó una ligera modificación en la hoja de información al paciente que también fue aprobada por el CEICLAR el 03/09/2014 (Anexo 4).

## 4. RESULTADOS

---



## 4. Resultados

### 4.1. Estadística descriptiva

Inicialmente se incluyeron en el estudio 92 pacientes diagnosticados de LARC en el área sanitaria de La Rioja desde el 1 de enero de 2006 hasta el 31 de diciembre de 2017. Sin embargo, en 15 de ellos las muestras histológicas estaban deterioradas y no pudieron ser sometidas a ultrasecuenciación masiva, por lo que se decidió excluirlos del estudio y analizar únicamente los 77 pacientes restantes. Se presentan los datos desglosados por fases (exploración y validación) y el total.

#### 4.1.1. Datos epidemiológicos

##### 4.1.1.1. Procedencia

El 89,6% de los pacientes se diagnosticaron en el Hospital San Pedro (HSP) de Logroño y el 10,4% lo hicieron en la Fundación Hospital de Calahorra (FHC) (Tabla 17). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,006$ )

Fase	n	HSP	%	FHC	%
Fase de exploración	41	33	80,5	8	19,5
Fase de validación	36	36	100	0	0
Total	77	69	89,6	8	10,4

##### 4.1.1.2. Edad

La edad al diagnóstico oscila entre los 30 y los 79 años con una media de edad de 62,5 4 años (Tabla 18). La cohorte de validación tenía una edad ligeramente superior. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,019$ ).

Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS
Fase de exploración	41	59,9	40	79	9,7
Fase de validación	36	65,3	30	78	9,8
Total	77	62,4	30	79	10,1

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.1.3. Sexo

Existe un claro predominio del sexo masculino con un 74% de todos los casos (Tabla 19). En la fase de exploración la proporción de hombres fue superior (80,5%). No encontramos diferencias entre ambas cohortes ( $p = 0,199$ ).

Tabla 19. Sexo.					
Fase	n	Mujeres	%	Hombres	%
Fase de exploración	41	8	19,5	33	80,5
Fase de validación	36	12	33,3	24	66,7
Total	77	20	26	57	74

#### 4.1.1.4. Tabaquismo

Se insinúa un porcentaje ligeramente superior de pacientes con antecedentes de tabaquismo (fumador o ex – fumador) frente a los no fumadores, pero sin diferencias significativas ( $p = 0,651$ ) (Tabla 20).

Tabla 20. Tabaquismo.					
Fase	n	Nunca fumador	%	Fumador o ex - fumador	%
Fase de exploración	41	18	43,9	23	56,1
Fase de validación	36	18	50	18	50
Total	77	36	46,8	41	53,2

#### 4.1.2. Características tumorales

##### 4.1.2.1. Localización tumoral

Clasificamos a los LARC en tres categorías en función de la distancia endoscópica del margen anal a la superficie tumoral: recto inferior (de 0 a 5 cm), recto medio (de 6 a 10 cm) y recto superior (de 11 a 15 cm) (Tabla 21). La gran mayoría de LARC se localizaron en el tercio medio y el tercio inferior.

Tabla 21. Localización tumoral							
Fase	n	Recto inferior	%	Recto medio	%	Recto superior	%
Fase de exploración	41	19	46,3	17	41,5	5	12,2
Fase de validación	36	14	38,9	18	50	4	11,1
Total	77	33	42,9	35	45,5	9	11,7

#### 4.1.2.2. Estadio clínico al diagnóstico (cTNM)

##### 4.1.2.2.1. Tamaño tumoral (T)

La categoría T determina el nivel de invasión del tumor primario en la pared rectal. En nuestra muestra, el 88,3% de los pacientes presentaban invasión de la grasa perirrectal (T3). Únicamente un 6,5% de pacientes fueron T4 (Tabla 22).

Tabla 22. Tamaño tumoral							
Fase	n	T2	%	T3	%	T4	%
Fase de exploración	41	2	4,9	37	90,2	2	4,9
Fase de validación	36	2	5,6	31	86,1	3	8,3
Total	77	4	5,2	68	88,3	5	6,5

##### 4.1.2.2.2. Afectación ganglionar (N)

Casi el 60% de los pacientes presentaban afectación ganglionar clínica al diagnóstico (N1 o N2) mientras que el 41,6% no lo presentaban (Tabla 23).

Tabla 23. Afectación ganglionar.							
Fase	n	N0	%	N1	%	N2	%
Fase de exploración	41	17	41,5	22	53,6	2	4,9
Fase de validación	36	15	41,6	16	44,4	5	13,8
Total	77	32	41,6	38	49,3	7	9,1

##### 4.1.2.2.3. Estadio clínico >cT3N0

Para simplificar y evaluar adecuadamente el “*downstaging*” tumoral tras el tratamiento neoadyuvante, decidimos agrupar los estadios clínicos únicamente en dos grupos determinando como punto de corte el estadio IIA (cT3N0). No se objetivaron diferencias entre ambas cohortes ( $p = 1,000$ ) (Tabla 24).

Tabla 24. Estadio clínico combinado					
Fase	n	>cT3N0	%	≤cT3N0	%
Fase de exploración	41	23	56,1	18	43,9
Fase de validación	36	20	55,6	16	44,4
Total	77	43	55,8	34	44,2

#### 4.1.2.3. Inestabilidad de microsatélites (MSI)

El 86% de los LARC no presentaban inestabilidad de microsatélites (MSS) evaluado por inmunohistoquímica. En torno al 12% presentaban MSI y sólo en 2 pacientes no se pudo determinar este estatus por problemas técnicos. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,079$ ) (Tabla 25).

Tabla 25. Inestabilidad de microsatélites							
Fase	n	MSI	%	MSS	%	Perdidos	%
Fase de exploración	41	2	4,9	37	90,2	2	4,9
Fase de validación	36	7	19,4	29	80,6	0	0
Total	77	9	11,7	66	85,7	2	2,6

#### 4.1.2.4. Mutaciones en KRAS

La tasa global de mutaciones en el gen KRAS fue del 24,7%, con una tasa de mutaciones ligeramente superior en la primera cohorte. Sin embargo, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,791$ ) (Tabla 26).

Tabla 26. Mutaciones en KRAS							
Fase	n	KRAS mutado	%	KRAS WT	%	Perdidos	%
Fase de exploración	41	11	26,8	29	72,5	1	2,4
Fase de validación	36	8	22,2	28	77,8	0	0
Total	77	19	24,7	57	74	1	1,3

#### 4.1.2.5. Grado de diferenciación

El grado de diferenciación tumoral según el sistema del CAP demostró que la gran mayoría de tumores eran moderadamente diferenciados (75,3%) con más tumores G3 en la cohorte de exploración, aunque sin diferencias significativas ( $p = 0,203$ ) (Tabla 27).

Tabla 27. Grado de diferenciación							
Fase	n	G1	%	G2	%	G3	%
Fase de exploración	41	4	9,8	29	70,7	8	19,5
Fase de validación	36	4	11,1	29	80,6	3	8,3
Total	77	8	10,4	58	75,3	11	14,3

### 4.1.3. Determinaciones analíticas al diagnóstico

#### 4.1.3.1. Marcadores tumorales

##### 4.1.3.1.1. Antígeno carcinoembrionario (CEA)

Se dispuso de los niveles de CEA al diagnóstico en el 83,7% de los casos. La media de CEA fue de 10,7 ng/mL (Tabla 28). Se realizó un análisis comparativo (U de Mann-Whitney) que demostró la ausencia de diferencias significativas ( $p = 0,094$ ).

Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin CEA	%
Fase de exploración	41	14,6	0,8	77,5	19,8	7	17,1
Fase de validación	36	5,9	0,6	43	7,9	8	22,2
Total	77	10,7	0,6	77,5	16,1	15	16,3

Rango de normalidad: 0 – 5 ng/mL. DS: desviación típica o estándar.

##### 4.1.3.1.2. Antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9)

Solo se dispuso de los niveles de CA 19.9 al diagnóstico en el 46,8% de los casos. La media de CA19.9 siempre se encontró dentro del rango de normalidad y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,158$ ) (Tabla 29).

Fase	N	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin CA19.9	%
Fase de exploración	41	24,0	0,6	82,7	23,7	25	61
Fase de validación	36	15,1	1,3	62,5	12,1	16	47,1
Total	77	19,0	0,6	82,7	19,1	31	40,2

Rango de normalidad: 0 – 35 U/mL. DS: desviación típica o estándar.

##### 4.1.3.2. Hemograma 1

Los datos hematológicos de la analítica 1 se recogieron de la analítica basal antes del inicio de la QRT neoadyuvante. Se obtuvieron datos del 88,3% de los pacientes.

#### 4.1.3.2.1. Leucocitos 1

La media global de leucocitos al diagnóstico fue 7.882 c/mm<sup>3</sup> con una media ligeramente más elevada en la cohorte de la fase de validación, pero sin diferencias estadísticamente significativas (p = 0,768) (Tabla 30).

Tabla 30. Niveles de Leucocitos 1 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	33	7.678,4	5.400	14.110	1.968,4	8	19,5
Fase de validación	35	8.074,2	4.800	22.100	3.134,7	1	2,7
Total	68	7.882,2	4.800	22.100	2.622,3	9	11,7

Rango de normalidad: 4.000 – 11.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.3.2.2. Neutrófilos 1

La media de neutrófilos al diagnóstico fue 4.757,2 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias significativas entre fases (p = 0,726) (Tabla 31).

Tabla 31. Niveles de Neutrófilos 1 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	33	4.711,8	2.900	9.700	1.534,6	8	19,5
Fase de validación	35	4.800,0	1.800	17.900	2.596,2	1	2,7
Total	68	4.757,2	1.800	17.900	2.132,4	9	11,7

Rango de normalidad: 1.900 – 8.000 c/mm<sup>3</sup>. dS: Desviación típica o estándar.

#### 4.1.3.2.3. Linfocitos 1

La media de linfocitos al diagnóstico fue 2.234,1 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias relevantes entre cohortes (p = 0,197) (Tabla 32).

Tabla 32. Niveles de Linfocitos 1 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	33	2.130,9	1.100	4.600	785,9	8	19,5
Fase de validación	35	2.331,4	600	4.600	864,2	1	2,7
Total	68	2.234,1	600	4.600	827,1	9	11,7

Rango de normalidad: 900 – 5.200 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.3.2.4. Monocitos 1

La media de linfocitos al diagnóstico fue 640,1 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias estadísticamente significativas (p = 0,098) (Tabla 33).

Tabla 33. Niveles de Monocitos 1 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	33	585,7	300	1.100	182,0	8	19,5
Fase de validación	35	691,4	300	1.500	271,5	1	2,7
Total	68	640,1	300	1.500	236,8	9	11,7

Rango de normalidad: 200 – 1.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.3.2.5. Ratio neutrófilo/linfocito (NLR1)

La media de NLR1 fue de 2,4 sin diferencias entre cohortes (p = 0,275) (Tabla 34).

Tabla 34. NRL1.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	33	2,4	1,1	5,3	1,0	8	19,5
Fase de validación	35	2,3	0,7	7,6	1,4	1	2,7
Total	68	2,4	0,7	7,6	1,3	9	11,7

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.3.2.6. Ratio linfocito/monocito (LMR1)

La media de LMR1 fue de 3,7 sin diferencias entre cohortes (p = 0,504) (Tabla 35).

Tabla 35. LMR1.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	33	3,8	1,5	9,2	1,5	8	19,5
Fase de validación	35	3,6	1,5	7,7	1,4	1	2,7
Total	68	3,7	1,5	9,2	1,5	9	11,7

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.3.2.7. Hemoglobina 1 (Hb1)

La media de Hb1 fue 13,8 g/dL sin diferencias entre fases ( $p = 0,663$ ) (Tabla 36).

Tabla 36. Niveles de Hemoglobina 1 (g/dL).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	33	13,8	9	17	2,1	8	19,5
Fase de validación	35	13,8	10	16	1,3	1	2,7
Total	68	13,8	9	17	1,7	9	11,7

Rango de normalidad: 13,5 – 17,5 g/dL. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.3.2.8. Plaquetas 1

La media de plaquetas 1 fue de 250.470 c/mm<sup>3</sup> con diferencias estadísticamente significativas entre ambas fases ( $p = 0,016$ ) (Tabla 37).

Tabla 37. Niveles de Plaquetas 1 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	33	265.272	164.000	397.000	63.069,5	8	19,5
Fase de validación	35	236.514	89.000	724.000	99.851,4	1	2,7
Total	68	250.470	89.000	724.000	84.670,2	9	11,7

Rango de normalidad: 150.000 – 425.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.3.2.9. Ratio plaquetas/linfocitos (PLR1)

La media del PLR1 fue más elevada en la cohorte de la fase de exploración con diferencias estadísticamente significativas entre ambas fases ( $p = 0,011$ ) (Tabla 38).

Tabla 38. PLR1.							
Fase	N	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	33	137,7	54,7	324,5	55,0	8	19,5
Fase de validación	35	115,1	42,3	350,0	64,5	1	2,7
Total	68	126,1	42,3	350	60,7	9	11,7

DS: desviación típica o estándar

### 4.1.3.3. Bioquímica

Los parámetros bioquímicos de la analítica inicial al diagnóstico no objetivaron diferencias estadísticas entre las fases de exploración y validación salvo entre los niveles de LDH ( $p < 0,001$ ), GOT ( $p = 0,043$ ) y albúmina ( $p = 0,044$ ) (Tablas 39-41).

Tabla 39. Bioquímica 1.							
Fase de exploración							
	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Glucosa (mg/dL)	41	113,9	73	21	49,8	9	22
Urea (mg/dL)		34	21	63	9,7	9	22
Creatinina (mg/dL)		0,85	0,56	1,49	0,2	9	22
Ácido úrico (mg/dL)		4,9	2,8	7,2	1,2	21	51
Sodio (mmol/L)		142	137	147	2,7	12	29
Potasio (mmol/L)		4,4	3,5	5,3	0,38	12	29
Triglicéridos (mg/dL)		119,1	69	239	50,5	22	54
Colesterol (mg/dL)		208,5	160	302	38,0	18	44
HDL-CT (mg/dL)		55	44	91	14,6	32	78
LDL-CT (mg/dL)		120,2	81	182	31,7	32	78
LDH (UI/L)		326,8	227	507	71,2	19	46
GOT (UI/L)		21,2	10	59	9,5	9	22
GPT (UI/L)		18,8	6	55	10,9	9	22
GGT (UI/L)		38,4	8	393	68,7	10	24
Bilirrubina (mg/dL)		0,5	0	1	0,2	12	29
FA (UI/L)		80,1	53	161	26,1	10	24
Ferritina (mcg/dL)		119,4	10	282	81,5	26	63
Hierro (mcg/dL)		76,5	18	206	45,9	19	46
Calcio (mg/dL)		9,4	8,3	10,2	0,4	24	59
Proteínas (g/dL)		7,2	6,5	7,8	0,3	23	56
Albúmina (g/dL)	4,7	3,8	9,1	1,2	27	66	

Rangos de normalidad: glucosa: 70 – 100mg/dL; urea: 10 – 50mg/dL; creatinina: 0,50 – 0,90mg/dL; ác. úrico: mg/dL; Na+: 135 – 148mmol/L; K+: 3,6 – 5,1 mol/L; triglicéridos: 0 - 200mg/dL; colesterol:100 - 200mg/dL; HDL-CT: 45 - 110mg/dL; LDL-CT: 90 - 160mg/dL; LDH: 120 – 250 U/L; GOT: 0 – 40U/L; GPT: 0 – 40U/L; GGT: 6 – 42U/L; bilirrubina: 0,0 – 1,2mg/dL; FA: 35 – 104U/L; ferritina: 25 – 310 µcg/dL; hierro: 34 – 172µg/dL calcio: 8,0 – 11,0mg/dL.; proteínas: 6,2 – 8,4g/dL; albúmina: 3,5 – 4,9g/dL. DS: desviación típica o estándar

**Tabla 40. Bioquímica 2.**

Fase de validación							
	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
<b>Glucosa</b> (mg/dL)	36	111,7	79	232	33,0	1	3
<b>Urea</b> (mg/dL)		37,6	16	73	13,5	2	6
<b>Creatinina</b> (mg/dL)		0,87	0,5	1,4	0,2	2	6
<b>Ácido úrico</b> (mg/dL)		5,3	0,8	10,1	1,9	3	8
<b>Sodio</b> (mmol/L)		142,4	136	150	2,9	3	8
<b>Potasio</b> (mmol/L)		4,5	3,7	5,6	0,4	3	8
<b>Triglicéridos</b> (mg/dL)		96,4	41	150	26,7	10	278
<b>Colesterol</b> (mg/dL)		194,2	124	257	38,4	9	25
<b>HDL-CT</b> (mg/dL)		52,7	29	86	18,7	25	69
<b>LDL-CT</b> (mg/dL)		115,8	75	170	34,4	25	69
<b>LDH</b> (UI/L)		211,9	117	396	73,3	9	25
<b>GOT</b> (UI/L)		17,1	7	31	5,1	3	8
<b>GPT</b> (UI/L)		16,5	7	36	7,5	3	8
<b>GGT</b> (UI/L)		28	10	68	16,3	3	8
<b>Bilirrubina</b> (mg/dL)		0,4	0,2	1,1	0,2	4	11
<b>FA</b> (UI/L)		83,2	44	389	58,8	4	11
<b>Ferritina</b> (mcg/dL)		145,5	20	541	134,9	23	64
<b>Hierro</b> (mcg/dL)		68,0	27	187	37,2	7	19
<b>Calcio</b> (mg/dL)		9,4	8,6	10,0	0,4	10	28
<b>Proteínas</b> (g/dL)	6,9	6,5	7,8	0,3	10	28	
<b>Albúmina</b> (g/dL)	4,2	3,6	4,8	0,3	11	31	

<b>Tabla 41. Bioquímica 3.</b>							
<b>Total</b>							
	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>DS</b>	<b>Sin datos</b>	<b>%</b>
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	77	112,5	73	303	41,5	10	13
<b>Urea (mg/dL)</b>		35,8	16	73	11,9	10	13
<b>Creatinina (mg/dL)</b>		0,8	0,5	1,5	0,2	10	13
<b>Ácido úrico (mg/dL)</b>		5,1	0,8	10,1	1,6	30	39
<b>Sodio (mmol/L)</b>		142,2	136	150	2,8	15	19
<b>Potasio (mmol/L)</b>		4,5	3,5	5,6	0,4	15	19
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>		106,0	41	230	39,7	32	41
<b>Colesterol (mg/dL)</b>		200,8	124	302	38,5	27	35
<b>HDL-CT (mg/dL)</b>		53,7	29	91	16,6	57	74
<b>LDL-CT (mg/dL)</b>		117,8	75	182	32,4	57	74
<b>LDH (UI/L)</b>		263,5	117	507	92,0	28	36
<b>GOT (UI/L)</b>		19,1	7	59	7,8	11	14
<b>GPT (UI/L)</b>		17,5	6	55	9,2	10	13
<b>GGT (UI/L)</b>		33,0	8	393	48,8	13	17
<b>Bilirrubina (mg/dL)</b>		0,5	0,1	1,1	0,2	16	21
<b>FA (UI/L)</b>		81,7	44	389	45,4	14	18
<b>Ferritina (mcg/dL)</b>		108,2	10	541	108,2	49	64
<b>Hierro (mcg/dL)</b>		71,7	18	206	41,0	26	34
<b>Calcio (mg/dL)</b>		9,4	8,3	10,2	0,4	34	44
<b>Proteínas (g/dL)</b>		7,0	6,5	7,8	0,3	33	43
<b>Albúmina (g/dL)</b>	4,4	3,6	9,1	0,8	38	49	

#### 4.1.4. Variables relacionadas con el tratamiento neoadyuvante.

##### 4.1.4.1. Tipo de quimioterapia (QT) concomitante

El 67% de los pacientes recibieron 5FU en infusión continua (5FUic) concomitante con radioterapia, si bien el porcentaje fue mayoritario en la fase de exploración ( $p = 0,002$ ), en la fase de validación el 50% recibió capecitabina ( $p = 0,001$ ) (Tabla 42).

Tabla 42. Tipo de QT concomitante.							
Fase	n	5FUic	%	Capecitabina	%	FOLFOX	%
Fase de exploración	41	34	83	6	15	1	2
Fase de validación	36	18	50	18	50	0	0
Total	77	52	67,5	24	31,2	1	1,3

##### 4.1.4.2. Tiempo desde el diagnóstico hasta el inicio de la QRT (DDQRT)

El tiempo en días desde el diagnóstico inicial hasta el inicio del tratamiento neoadyuvante con QRT fue de 54 días de media, siendo mayor en el grupo de la fase de validación con diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,002$ ) (Tabla 43).

Tabla 43. DDQRT (días).					
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS
Fase de exploración	41	48,4	14	89	16,1
Fase de validación	36	60,0	28	100	16,0
Total	77	53,8	14	100	16,9

DS: desviación típica o estándar.

##### 4.1.4.3. Tiempo desde el fin de la QRT a la cirugía (DQRTCX)

El tiempo en días desde el fin de la QRT a la cirugía fue de 47,9 días de media, sin diferencias significativas entre ambas fases ( $p = 0,253$ ) (Tabla 44).

Tabla 44. DQRTCX (días)					
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS
Fase de exploración	41	46,6	29	62	16,1
Fase de validación	36	49,4	28	84	12,3
Total	77	47,9	28	84	10,5

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.5. Determinaciones analíticas tras la QRT

##### 4.1.5.1. Hemograma 2

Los datos hematológicos de la analítica 2 se recogieron de la primera analítica obtenida tras la QRT neoadyuvante. Se obtuvieron datos del 94,8% de los pacientes.

##### 4.1.5.1.1. Leucocitos 2

La media global de leucocitos 2 fue 5.476,1 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas ( $p = 0,380$ ) (Tabla 45).

Tabla 45. Leucocitos 2 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	37	5.239,4	3.100	11.700	1.906,0	4	9,7
Fase de validación	36	5.719,4	2.100	19.000	2.803,5	0	0
Total	73	5.476,1	2.100	19.000	2.386,5	4	4,3

Rango de normalidad: 4.000 – 11.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

##### 4.1.5.1.2. Neutrófilos 2

La media de neutrófilos 2 fue 3.708,9 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias ( $p = 0,860$ ) (Tabla 46).

Tabla 46. Neutrófilos 2 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	37	3.671,6	1.800	8.800	1.669,9	4	9,7
Fase de validación	36	3.747,2	1.100	16.600	2.603,3	0	0
Total	73	3.708,9	1.100	16.600	2.165,7	4	4,3

Rango de normalidad: 1.900 – 8.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

##### 4.1.5.1.3. Linfocitos 2

La media de linfocitos 2 fue 977,5 c/mm<sup>3</sup>, con unos niveles medios mayores en la fase de validación con diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,010$ ) (Tabla 47).

Tabla 47. Linfocitos 2 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	37	839,4	300	1.600	376,4	4	9,7
Fase de validación	36	1.119,4	500	3.000	491,5	0	0
Total	73	977,5	300	3.000	456,2	4	4,3

Rango de normalidad: 900 – 5.200 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.5.1.4. Monocitos 2

La media de monocitos 2 tras la QRT fue 550,5 c/mm<sup>3</sup>, siendo más elevada en la fase de validación al borde de la significación estadística ( $p = 0,058$ ) (Tabla 48).

Tabla 48. Monocitos 2 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	37	507,8	200	800	164,1	4	9,7
Fase de validación	36	594,4	100	1400	229,2	0	0
Total	73	550,5	100	1400	202,2	4	4,3

Rango de normalidad: 200 – 1.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.5.1.5. Ratio neutrófilo/linfocito (NLR2)

La media de NLR2 fue de 4,6 siendo superior en la fase de exploración con diferencias estadísticamente significativas entre ambas fases ( $p = 0,012$ ) (Tabla 49).

Tabla 49. NLR 2.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	37	5,4	1,3	15,5	1,0	4	9,7
Fase de validación	36	3,8	1,3	20,7	3,3	0	0
Total	73	4,6	1,3	20,7	3,5	4	4,3

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.5.1.6. Ratio linfocito/monocito (LMR2)

La media de LMR2 fue de 1,9 siendo ligeramente mayor en la fase de validación, pero sin diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,196$ ) (Tabla 50).

Tabla 50. LMR2.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	37	1,7	0,5	4,5	0,9	4	9,7
Fase de validación	36	2,2	0,5	10	1,6	0	0
Total	73	1,9	0,5	10	1,3	4	4,3

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.5.1.7. Hemoglobina 2

La media de hemoglobina tras la QRT fue 13,1 g/dL, sin diferencias entre las fases ( $p = 0,109$ ) (Tabla 51).

Tabla 51. Niveles de Hemoglobina 2 (g/dL).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	37	13,4	7,8	17,3	1,8	4	9,7
Fase de validación	36	12,8	9,9	15,5	1,2	0	0
Total	73	13,1	7,8	17,3	1,6	4	4,3

Rango de normalidad: 13,5 – 17,5 g/dL. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.5.1.8. Plaquetas 2

La media de plaquetas tras la QRT fue 228.931,5 c/mm<sup>3</sup> ligeramente mayor en la fase de exploración, pero sin diferencias estadísticas ( $p = 0,099$ ) (Tabla 52).

Tabla 52. Niveles de Plaquetas 2 (c/mm <sup>3</sup> ).							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	37	239.027,0	148.000	456.000	75.479,0	4	9,7
Fase de validación	36	218.555,5	114.000	779.000	106.925,9	0	0
Total	73	228.931,5	114.000	779.000	92.263,4	4	4,3

Rango de normalidad: 150.000 – 425.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.5.1.9. Ratio plaquetas/linfocitos (PLR2)

La media del PLR2 fue más elevada en la cohorte de la fase de exploración con diferencias estadísticamente significativas entre ambas fases ( $p = 0,001$ ) (Tabla 53).

Tabla 53. PLR2.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	37	360,3	135,6	1.140	243,9	4	9,7
Fase de validación	36	225,6	57	973,7	149,1	0	0
Total	73	293,9	57	1.140	212,5	4	4,3

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.6. Variables relacionadas con la cirugía

##### 4.1.6.1. Tiempo desde el diagnóstico a la cirugía (DDCX)

El tiempo en días desde el diagnóstico inicial a la cirugía fue de 141 días de media, siendo mayor en el grupo de la fase de validación con diferencias estadísticamente significativas entre ambas fases ( $p = 0,004$ ) (Tabla 54).

Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS
Fase de exploración	41	134,5	95	177	18,6
Fase de validación	36	148,4	100	191	22,9
Total	77	141,0	95	191	21,8

DS: desviación típica o estándar.

##### 4.1.6.2. Tipo de cirugía

El 42,8% de los pacientes fue intervenido realizándose la técnica de amputación abdómino-perineal (AAP), siendo esta más empleada en la fase de exploración (46,3% vs 39%) pero sin diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,646$ ) (Tabla 55).

Fase	n	AAP	%	No AAP	%	Irresecable	%
Fase de exploración	41	19	46,3	22	53,7	0	0
Fase de validación	35	14	39	21	58,3	1	2,7
Total	76	33	42,8	43	56	1	1,3

##### 4.1.6.3. Estadio clínico >ypT3N0

Para evaluar el “*downstaging*” tumoral clínico agrupamos los estadios tomando como punto de corte el estadio IIA (ypT3N0). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre fases ( $p = 0,604$ ) (Tabla 56).

Fase	n	>ypT3N0	%	≤ypT3N0	%
Fase de exploración	41	12	29,3	29	70,7
Fase de validación	36	8	22,2	28	77,8
Total	77	20	26	57	74

#### 4.1.6.4. Estadios ypTNM

El estadio patológico tras la cirugía (ypTNM) mostró un 9,1% de respuestas completas patológicas (ypT0N0), obteniéndose todas ellas en la cohorte de validación (Tabla 57).

ypTNM	Fase de exploración		Fase de validación		Total	
	n	%	n	%	n	%
ypT0N0	0	0	7	19,4	7	9,1
ypT1N0	5	12,2	1	2,8	6	7,8
ypT2N0	13	31,7	9	25	22	28,6
ypT2N1	2	4,9	2	5,6	4	5,2
ypT2N2	2	4,9	0	0	2	2,6
ypT3N0	7	17,1	9	25	16	20,8
ypT3N1	6	14,6	4	11,1	10	13
ypT3N2	6	14,6	1	2,8	7	9,1
ypT4N0	0	0	0	0	0	0
ypT4N1	0	0	2	5,6	2	2,6
ypT4N2	0	0	1	2,8	1	1,3
<b>Total</b>	41	100	36	100	77	100

#### 4.1.6.5. Grado de regresión tumoral (GRT)

El 37,8% de los pacientes presentó una respuesta completa o casi completa (GRT 0-1) frente al 62,2% con respuesta mínima o pobre (GRT 2-3). La cohorte de validación presentó una mayor tasa de pacientes con respuesta pobre (24,4% vs 8,3%) (Tablas 58 y 59). En el GRT agrupado no se objetivaron diferencias significativas ( $p = 0,636$ ).

GRT	Fase de exploración		Fase de validación		Total	
	n	%	n	%	n	%
GRT0	0	0	7	19,4	7	9,1
GRT1	14	34,1	7	19,4	21	27,3
GRT2	16	39	17	47,2	33	42,8
GRT3	10	24,4	3	8,3	13	16,9
Perdidos	1	2,4	2	5,5	3	3,9
<b>Total</b>	41	100	36	100	77	100

Abreviaturas: GRT0: respuesta completa. GRT1: respuesta casi completa. GRT2: respuesta parcial. GRT3: respuesta pobre o escasa.

<b>Fase</b>	<b>n</b>	<b>GRT 0-1</b>	<b>%</b>	<b>GRT 2-3</b>	<b>%</b>
Fase de exploración	40	14	35	26	65
Fase de validación	34	14	41,2	20	58,8
Total	74	28	37,8	46	62,2

Abreviaturas: GRT0-1: buena respuesta. GRT2-3: respuesta escasa.

#### **4.1.6.6. Grado histológico post-neoadyuvancia**

La mayoría de casos presentó un grado moderado de diferenciación (62,3%). El grupo de la fase de exploración presentó más pacientes con G3 (14,6% vs 2,8%) (Tabla 60). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre grados y fases.

<b>GRT</b>	<b>Fase de exploración</b>		<b>Fase de validación</b>		<b>Total</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>G1</b>	2	4,9	5	13,9	7	9,1
<b>G2</b>	32	78	16	44,4	48	62,3
<b>G3</b>	6	14,6	1	2,8	7	9,1
<b>Perdidos</b>	1	2,4	14	38,9	15	19,5
<b>Total</b>	41	100	36	100	77	100

Abreviaturas: G1: bien diferenciado. G2: moderadamente diferenciado. G3: pobremente diferenciado.

#### **4.1.6.7. Invasión vascular extramural (EMVI)**

El 10,4% de los pacientes presentaron EMVI, siendo más frecuente en la fase de exploración (17,1% vs 2,8%%). No se obtuvieron datos en el 17% de los pacientes de la fase de validación. No se objetivan diferencias estadísticas ( $p = 0,128$ ) (Tabla 61).

<b>Fase</b>	<b>n</b>	<b>EMVI</b>	<b>%</b>	<b>No EMVI</b>	<b>%</b>	<b>Sin datos</b>	<b>%</b>
Fase de exploración	41	7	17,1	34	82,9	1	2,8
Fase de validación	36	1	2,8	28	77,8	6	17,1
Total	77	8	10,4	62	80,5	7	9,1

#### 4.1.6.8. Invasión linfovascular (LVI)

El 11,7% de los pacientes presentaron invasión linfática, siendo más frecuente en la fase de exploración (19,5% vs 2,8%). No se obtuvieron datos en un 10,4% del total de pacientes, la mayoría en la fase de validación ni tampoco se objetivaron diferencias entre cohortes ( $p = 0,069$ ) (Tabla 62).

Tabla 62. Invasión linfática.							
Fase	n	LVI	%	No LVI	%	Sin datos	%
Fase de exploración	41	8	19,5	32	78	1	2,4
Fase de validación	36	1	2,8	28	77,8	7	19,4
Total	77	9	11,7	60	77,9	8	10,4

#### 4.1.6.9. Invasión perineural (PNI)

El 19,5% de los pacientes presentaron invasión perineural, siendo más frecuente en la fase de exploración (34,1% vs 2,8%). No se obtuvieron datos en casi el 20% de los pacientes de la fase de validación (Tabla 63) pero sí se objetivan diferencias estadísticamente significativas entre ambas fases ( $p = 0,002$ )

Tabla 63. Invasión perineural.							
Fase	n	PNI	%	No PNI	%	Sin datos	%
Fase de exploración	41	14	34,1	27	65,9	0	0
Fase de validación	36	1	2,8	28	77,8	7	19,4
Total	77	15	19,5	55	71,4	7	9,1

#### 4.1.6.10. Afectación ganglionar (N+)

El 26% de los pacientes presentaron afectación ganglionar, siendo más habitual en la fase de exploración (34,1% vs 16,7%), pero sin diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,124$ ) (Tabla 64).

Tabla 64. Afectación ganglionar.							
Fase	n	N+	%	NO	%	Sin datos	%
Fase de exploración	41	14	34,1	27	65,9	0	0
Fase de validación	36	6	16,7	28	77,8	2	5,6
Total	77	20	26	55	71,4	2	2,6

#### 4.1.6.11. Número de ganglios positivos (Nx)

La media del número de ganglios infiltrados por metástasis fue de 1,3 siendo esta algo mayor en la fase de exploración (Tabla 65). No se objetivan diferencias por fases ( $p = 0,092$ )

<b>Tabla 65. Número de ganglios afectados.</b>					
<b>Fase</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>DS</b>
Fase de exploración	41	1,5	0	13	2,8
Fase de validación	34	1,1	0	29	4,9
Total	75	1,3	0	29	3,9

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.6.12. Número de ganglios resecaos (Nt)

La media del número de ganglios resecaos tras la cirugía fue de 9,2 siendo esta un poco mayor en la fase de validación (Tabla 66). No se objetivan diferencias por fases ( $p = 0,109$ )

<b>Tabla 66. Número de ganglios resecaos.</b>					
<b>Fase</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>DS</b>
Fase de exploración	40	8,2	0	23	5,2
Fase de validación	34	10,5	0	32	6,9
Total	74	9,2	0	32	6,1

DS: desviación típica o estándar.

### 4.1.7. Determinaciones analíticas tras la cirugía

#### 4.1.7.1. Hemograma 3

Los datos hematológicos de la analítica 3 se recogieron de la primera analítica obtenida aproximadamente al mes de la cirugía. Se obtuvieron datos en el 89,6% de los casos.

#### 4.1.7.1.1. Leucocitos 3

La media global de leucocitos 3 fue de 6.621,7 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias estadísticas (p = 0,914) (Tabla 67).

Tabla 67. Leucocitos 3.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	36	6.622,2	3.200	14.200	2.394,8	5	12,2
Fase de validación	33	6.621,2	3.400	13.300	2.429,6	3	8,3
Total	69	6.621,7	3.200	14.200	2.393,7	8	10,3

Rango de normalidad: 4.000 – 11.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.7.1.2. Neutrófilos 3

La media de neutrófilos 3 fue 4.780,8 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias por cohortes (p = 0,564) (Tabla 68).

Tabla 68. Neutrófilos 3.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	36	4.868,8	1.700	12.300	2.347,1	5	12,2
Fase de validación	33	4.684,8	2.200	12.000	2.217,9	3	8,3
Total	69	4.780,8	1.700	12.300	2.271,4	8	10,3

Rango de normalidad: 1.900 – 8.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.7.1.3. Linfocitos 3

La media de linfocitos fue de 1.005,2 c/mm<sup>3</sup>, con unos niveles medios mayores en la fase de validación, pero sin diferencias (p = 0,117) (Tabla 69).

Tabla 69. Linfocitos 3.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	36	912,7	300	2.400	439,9	5	12,2
Fase de validación	33	1.106,0	400	3.000	568,9	3	8,3
Total	69	1.005,2	300	3.000	511,3	8	10,3

Rango de normalidad: 900 – 5.200 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.7.1.4. Monocitos 3

La media de monocitos 3 tras la QRT fue de 584,2 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias estadísticas entre fases (p = 0,426) (tabla 70).

Tabla 70. Monocitos 3.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	36	575,2	300	1.600	254,3	5	12,2
Fase de validación	33	593,9	300	1.400	217,8	3	8,3
Total	69	584,2	300	1.600	236,0	8	10,3

Rango de normalidad: 200 – 1.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.7.1.5. Ratio neutrófilo/linfocito (NLR3)

La media de NLR3 fue de 6,2 sin diferencias por fases (p = 0,274) (Tabla 71).

Tabla 71. NLR3.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	36	6,9	0,7	18	4,8	5	12,2
Fase de validación	33	5,5	1,3	30	5,0	3	8,3
Total	69	6,2	0,7	30	4,9	8	10,3

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.7.1.6. Ratio linfocito/monocito (LMR3)

La media de LMR3 fue de 1,8 sin diferencias por fases (p = 0,203) (Tabla 72).

Tabla 72. LMR3							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	36	1,6	0,6	3,4	0,7	5	12,2
Fase de validación	33	1,9	0,4	5,0	1,0	3	8,3
Total	69	1,8	0,4	5	0,8	8	10,3

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.7.1.7. Hemoglobina 3

La media de hemoglobina 3 tras la cirugía fue 11,5 g/dL; sin diferencias por fases ( $p = 0,165$ ) (Tabla 73).

Tabla 73. Hemoglobina 3.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	36	11,3	7,9	15,1	1,7	5	12,2
Fase de validación	33	11,8	9,1	15,1	1,5	3	8,3
Total	69	11,5	7,9	15,1	1,6	8	10,3

Rango de normalidad: 13,5 – 17,5 g/dL. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.7.1.8. Plaquetas 3

La media de plaquetas 3 tras la cirugía fue de 293.637,6 c/mm<sup>3</sup>, sin diferencias por fases ( $p = 0,352$ ) (Tabla 74).

Tabla 74. Plaquetas 3.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	36	311.444,4	109.000	719.000	140.165,7	5	12,2
Fase de validación	33	274.212,1	153.000	486.000	93.035,1	3	8,3
Total	69	293.637,6	109.000	719.000	120.566,6	8	10,3

Rango de normalidad: 150.000 – 425.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.7.1.9. Ratio plaquetas/linfocitos (PLR3)

La media del PLR3 tras la cirugía fue de 353,0 siendo más elevada en la cohorte de la fase de exploración al borde de la significación estadística ( $p = 0,052$ ) (Tabla 75).

Tabla 75. PLR3							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	36	384,2	120,9	1.124,0	192,0	5	12,2
Fase de validación	33	318,8	62,3	1040	202,9	3	8,3
Total	69	353,0	62,3	1124	198,6	8	10,3

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.8. Variables relacionadas con el tratamiento adyuvante

##### 4.1.8.1. Quimioterapia (QT) adyuvante

Casi el 86% de los pacientes recibieron QT adyuvante tras la cirugía, sin diferencias entre ambas cohortes ( $p = 1,000$ ) (Tabla 76).

Fase	n	Sí QT	%	No QT	%
Fase de exploración	41	35	85,4	6	14,6
Fase de validación	36	31	86,1	5	13,9
Total	77	66	85,7	11	14,3

##### 4.1.8.2. Tipo de quimioterapia adyuvante

El 50% de los pacientes recibieron QT basada en fluoropirimidinas (33,3% 5FU en infusión continua y 16,7% capecitabina), frente al 50% que recibieron una combinación de fluoropirimidinas y oxaliplatino (33,3% FOLFOX y 16,7% XELOX).

Los pacientes de la validación recibieron más fluoropirimidinas en monoterapia (58,1%) mientras que los de la de exploración recibieron más combinaciones con oxaliplatino (57,1%). No obstante, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre fases ( $p = 0,324$ ) (Tabla 77).

QT	Fase de exploración		Fase de validación		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>5FUic</b>	11	31,4	11	35,5	22	33,3
<b>Capecitabina</b>	4	11,4	7	22,6	11	16,7
<b>FOLFOX</b>	17	48,6	5	16,1	22	33,3
<b>XELOX</b>	3	8,6	8	25,8	11	16,7
<b>Total</b>	35	100	31	100	66	100

#### 4.1.8.3. Tiempo desde la cirugía al inicio de la quimioterapia adyuvante (DCXQT)

El tiempo en días desde la fecha de la cirugía al inicio de la QT adyuvante fue de 51,1 días de media, sin diferencias entre cohortes ( $p = 0,534$ ) (Tabla 78).

Tabla 78. DCXQT.					
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS
Fase de exploración	35	52,3	26	210	33,6
Fase de validación	32	49,8	24	109	17,8
Total	67	51,1	24	210	27,1

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.9. Determinaciones analíticas tras la quimioterapia adyuvante/seguimiento

##### 4.1.9.1. Hemograma 4

Los datos hematológicos de la analítica 4 se recogieron de la primera analítica tras la finalización de la QT adyuvante (en caso de recibirla) o de la primera analítica de seguimiento. Se obtuvieron los datos en el 80,5% de los pacientes.

##### 4.1.9.1.1. Leucocitos 4

La media global de leucocitos 4 fue de 5.385,3 c/mm<sup>3</sup> con diferencias estadísticamente significativas entre ambas cohortes ( $p = 0,045$ ) (Tabla 79).

Tabla 79. Leucocitos 4.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	31	4.996,7	3.300	7.200	1.171,1	10	24,3
Fase de validación	31	5.861,2	2.800	10.700	2.022,1	5	13,9
Total	62	5.385,3	2.700	10.700	1.706,9	15	19,5

Rango de normalidad: 4.000 – 11.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.9.1.2. Neutrófilos 4

La media de neutrófilos 4 tras la QT adyuvante/seguimiento fue de 3.579,0 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias por fases ( $p = 0,157$ ) (Tabla 80).

Tabla 80. Neutrófilos 4.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	31	3.251,6	1.500	5.600	1.049,0	10	24,3
Fase de validación	31	3.906,4	1.300	8.800	1.770,4	5	13,9
Total	62	3.579,0	1.300	8.800	1.480,4	15	19,5

Rango de normalidad: 1.900 – 8.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.9.1.3. Linfocitos 4

La media de linfocitos 4 tras la QT adyuvante/seguimiento fue de 1.143,5 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias por fases ( $p = 0,206$ ) (Tabla 81).

Tabla 81. Linfocitos 4.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	31	1.080,6	400	2.200	460,0	10	24,3
Fase de validación	31	1.206,4	500	2.800	469,7	5	13,9
Total	62	1.143,5	400	2.800	465,4	15	19,5

Rango de normalidad: 900 – 5.200 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.9.1.4. Monocitos 4

La media de monocitos 4 tras la QT adyuvante/seguimiento fue de 520,9 c/mm<sup>3</sup> sin diferencias por fases ( $p = 0,291$ ) (Tabla 82).

Tabla 82. Monocitos 4.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	31	506,4	200	1.000	173,0	10	24,3
Fase de validación	31	535,4	100	800	183,5	5	13,9
Total	62	520,9	100	1.000	177,5	15	19,5

Rango de normalidad: 200 – 1.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.9.1.5. Ratio neutrófilo/linfocito (NLR4)

La media de NLR4 fue de 3,6 fue similar en ambos brazos ( $p = 0,966$ ) (Tabla 83).

Tabla 83. NLR4.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	31	3,5	1,0	8,0	1,9	10	24,3
Fase de validación	31	3,6	1,0	12,4	2,4	5	13,9
Total	62	3,6	1,0	12,4	2,1	15	19,5

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.9.1.6. Ratio linfocito/monocito (LMR4)

La media de LMR4 fue de 2,3 sin diferencias por fases ( $p = 0,517$ ) (Tabla 84).

Tabla 84. LMR4.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	31	2,2	1,0	4,4	0,9	10	24,3
Fase de validación	31	2,5	0,8	8,0	1,3	5	13,9
Total	62	2,3	0,8	8,0	1,1	15	19,5

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.9.1.7. Hemoglobina 4

La media de hemoglobina 4 tras la QT adyuvante/seguimiento fue de 13,4 g/dL; siendo ligeramente superior en la fase de exploración, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas por fases ( $p = 0,084$ ) (Tabla 85).

Tabla 85. Hemoglobina 4.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	31	13,8	10,0	16,8	1,5	10	24,3
Fase de validación	31	13,1	9,9	14,8	1,2	5	13,9
Total	62	13,4	9,9	16,8	1,4	15	19,5

Rango de normalidad: 13,5 – 17,5 g/dL. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.9.1.8. Plaquetas 4

La media de plaquetas 4 tras la QT adyuvante/cirugía fue de 202.403,2 c/mm<sup>3</sup> siendo similar en ambas cohortes (Tabla 86).

Tabla 86. Plaquetas 4.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	31	199.903,2	98.000	325.000	45.542,9	10	24,3
Fase de validación	31	204.903,2	78.000	449.000	64.621,1	5	13,9
Total	62	202.403,2	78.000	449.000	55.499,0	15	19,5

Rango de normalidad: 150.000 – 425.000 c/mm<sup>3</sup>. DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.9.1.9. Ratio plaquetas/linfocitos (PLR4)

La media del PLR4 tras la cirugía fue de 206,2, sin diferencias por fases (p = 0,822) (Tabla 87).

Tabla 87. PLR4.							
Fase	n	Media	Mínimo	Máximo	DS	Sin datos	%
Fase de exploración	31	213,6	86,4	432,0	86,4	10	24,3
Fase de validación	31	198,8	27,8	498,8	101,3	5	13,9
Total	62	206,2	27,8	498,8	93,7	15	19,5

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.10. Seguimiento

La mediana de seguimiento fue de 7,3 años, lógicamente más prolongada en la fase de exploración, pero sin diferencias por fases (p = 0,438) (Tabla 88)

Tabla 88. Seguimiento (años)					
Fase	n	Mediana	Mínimo	Máximo	DS
Fase de exploración	41	7,5	0,7	14,8	5,0
Fase de validación	36	6,7	1,5	10,5	2,7
Total	77	7,3	0,7	14,8	4,1

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.11. Recaída, supervivencia y mortalidad

##### 4.1.11.1. Recaídas de la enfermedad

Globalmente, recayeron el 40,3% de los pacientes de ambas cohortes, si bien el porcentaje fue más del doble en la cohorte de la fase de exploración con diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,012$ ) (Tabla 89).

Tabla 89. Recaídas de la enfermedad.					
Fase	n	Recaída	%	No recaída	%
Fase de exploración	41	22	53,7	19	46,3
Fase de validación	36	9	25	27	75
Total	77	31	40,3	56	59,7

##### 4.1.11.2. Supervivencia libre de recaída (SLR)

La supervivencia libre de recaída a 5 años fue de 45,1 meses para ambos grupos, siendo mayor en la cohorte de validación (Tabla 90). Se objetivan diferencias estadísticamente significativas entre ambas ( $p = 0,035$ ).

Tabla 90. Supervivencia libre de recaída (meses).						
Fase	n	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo
Fase de exploración	41	39,2	22,3	43,7	1	60,0
Fase de validación	36	49,1	19,9	60,0	3	60,0
Total	77	45,1	20,6	60,0	2	60,0

DS: desviación típica o estándar.

##### 4.1.11.3. Supervivencia global (SG)

La media de SG a 5 y 10 años fue de 49,2 y 73,3 meses para la cohorte de exploración y validación respectivamente, siendo superior en esta segunda (Tablas 91 y 92). Se escogió un punto de corte de supervivencia tope de 60 y 120 meses para el análisis a 5 y 10 años, de ahí los valores máximos de la tabla. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en SG total ( $p = 0,183$ ), ni en los puntos de corte a 5 años ( $p = 0,470$ ), ni a 10 años ( $p = 0,180$ ).

Tabla 91. Supervivencia global a 5 años					
Fase	n	Media	DS	Mínimo	Máximo
Fase de exploración	41	46,8	18,9	8	60
Fase de validación	36	52,0	12,7	19	60
Total	77	49,2	16,5	8	60

DS: desviación típica o estándar.

Tabla 92. Supervivencia global a 10 años.					
Fase	n	Media	DS	Mínimo	Máximo
Fase de exploración	41	77,3	44,2	8	120
Fase de validación	36	68,7	26,2	19	107
Total	77	73,3	36,9	8	120

DS: desviación típica o estándar.

#### 4.1.11.4. Fallecimientos

De los 77 pacientes que componen la cohorte total, fallecieron 35 (45,5%) siendo las defunciones más frecuentes en la cohorte de exploración (61% vs 27,8%) con diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes ( $p = 0,006$ ) (Tabla 93).

Tabla 93. Fallecimientos.					
Fase	n	Fallecidos	%	Vivos	%
Fase de exploración	41	25	61	16	39
Fase de validación	36	10	27,8	25	72,2
Total	77	35	45,5	31	54,5

#### 4.1.11.5. Fallecimientos por causas

Respecto a las causas de fallecimiento, el 74,4% fallecieron como consecuencia de la progresión del carcinoma de recto, con diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes ( $p = 0,016$ ) (Tabla 94).

Tabla 94. Fallecimientos por causas.					
Fase	n	Por progresión del LARC	%	Por otras causas	%
Fase de exploración	25	19	76	6	24
Fase de validación	10	7	70	3	30
Total	35	26	74,3	9	25,7

#### 4.1.12. Diferencias entre la cohorte de exploración y la de validación

Entre la cohorte de exploración y la de validación encontramos diferencias estadísticamente significativas entre algunas variables de ambas cohortes (Tabla 95). Entre los más relevantes destacan un mayor tiempo desde el DDCX en la cohorte de validación ( $p = 0,004$ ), y una mayor invasión perineural ( $p = 0,002$ ), porcentaje de recaídas (0,012) y menor SLR (0,035) y una mayor tasa de fallecimientos por LARC ( $p = 0,016$ ) en la fase de exploración, aunque esto no se tradujo en diferencias en SG.

<b>Tabla 95. Diferencias estadísticamente significativas más relevantes entre las cohortes de la fase de exploración y la de validación.</b>			
<b>Parámetro</b>	<b>Fase de exploración</b>	<b>Fase de validación</b>	<b>p-valor</b>
Procedencia FHC (%)	19,5	0	<b>0,006</b>
Edad (años, media)	59,9	65,3	<b>0,019</b>
Plaquetas 1 (c/mm <sup>3</sup> ; media)	265.272	236.514	<b>0,016</b>
PLR1 (media)	137,7	115,1	<b>0,011</b>
LDH (U/L; media)	326,8	211,9	<b>&lt;0,001</b>
GOT (U/L; media)	21,2	17,1	<b>0,043</b>
Albúmina (g/dL; media)	5,7	4,2	<b>0,044</b>
DDQRT (días; media)	48,4	60	<b>0,002</b>
Linfocitos 2 (c/mm <sup>3</sup> ; media)	839,4	1.119,4	<b>0,010</b>
NLR2 (media)	5,4	3,8	<b>0,012</b>
PLR2 (media)	360,3	225,6	<b>0,001</b>
DDCX (días; media)	134,5	148,4	<b>0,004</b>
Invasión perineural (%)	34,1	2,8	<b>0,002</b>
Leucocitos 4 (c/mm <sup>3</sup> ; media)	4.996,7	5.861,2	<b>0,045</b>
Recaídas (%)	53,7	25	<b>0,012</b>
SLR (meses; media)	39,2	49,1	<b>0,035</b>
Exitus totales (%)	61	27,8	<b>0,006</b>
Exitus por LARC (%)	76	70	<b>0,016</b>
SG a 5 años (meses, media)	46,8	52	<b>0,470</b>
SG a 10 años (meses, media)	77,3	68,7	<b>0,180</b>

## 4.2. Resultados por fases

### 4.2.1. Fase de exploración

El análisis de las 41 muestras mediante ultrasecuenciación masiva identificamos un modelo de cinco genes (Tabla 96) cuya expresión tenía un valor predictivo diferencial entre los grupos recaída y no recaída.

Experiment	Gen
1	ENSG00000116406
2	ENSG00000205918
3	ENSG00000230176
4	ENSG00000269937
5	ENSG00000270993

Para evaluar la capacidad pronóstica de este grupo de genes, utilizamos tres modelos estadísticos para calcular las curvas ROC (Figuras 70-73) (Tabla 97)

- 1) Modelo DLDA (*Diagonal Linear Discriminant Analysis*).
- 2) Modelo CCP (*Compound Covariate Predictor*).
- 3) Modelo BCCP (*Bayesian Compound Covariate Predictor*).

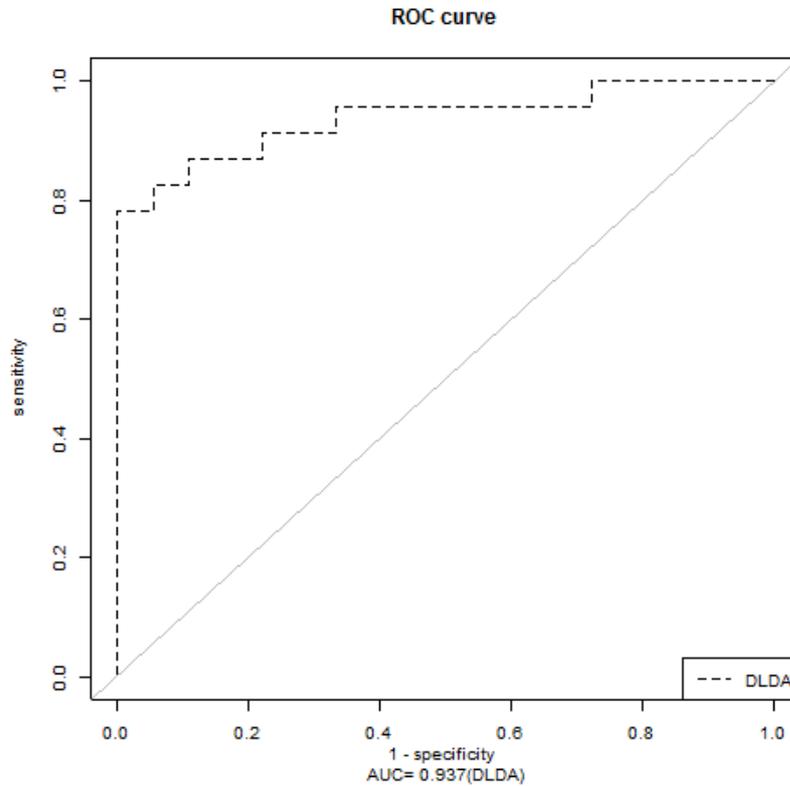
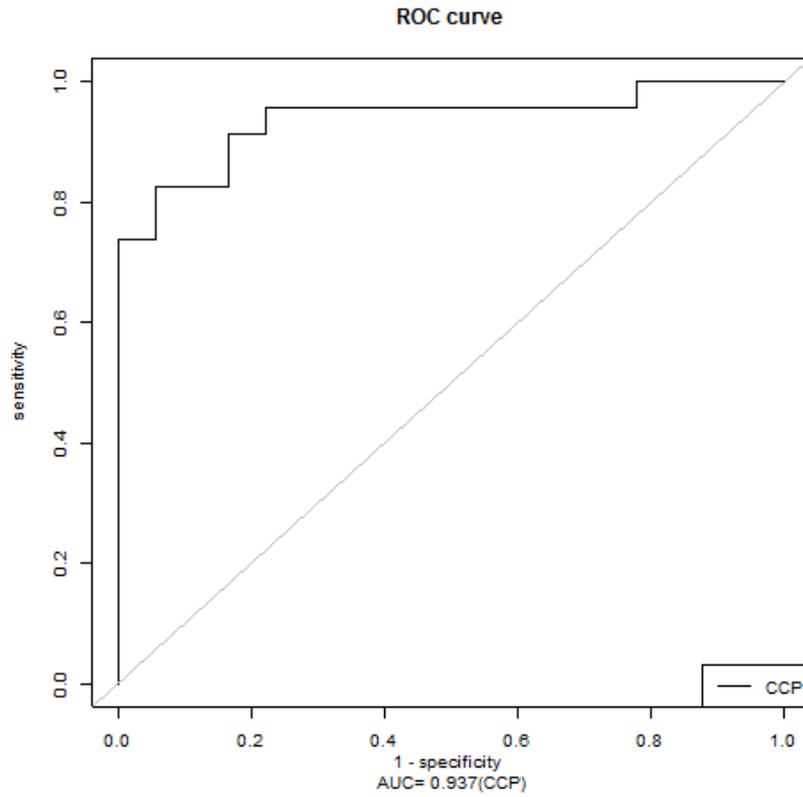
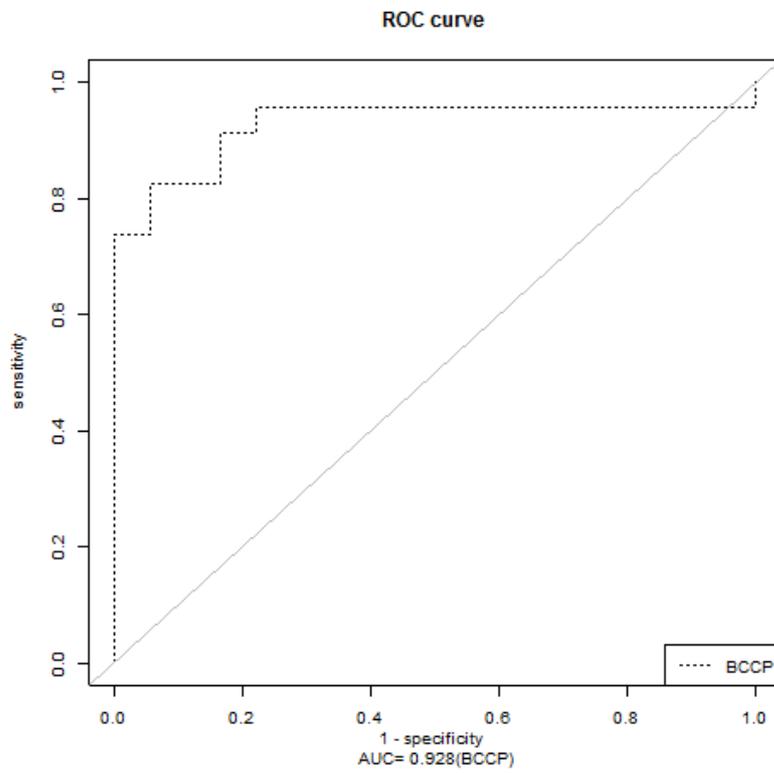


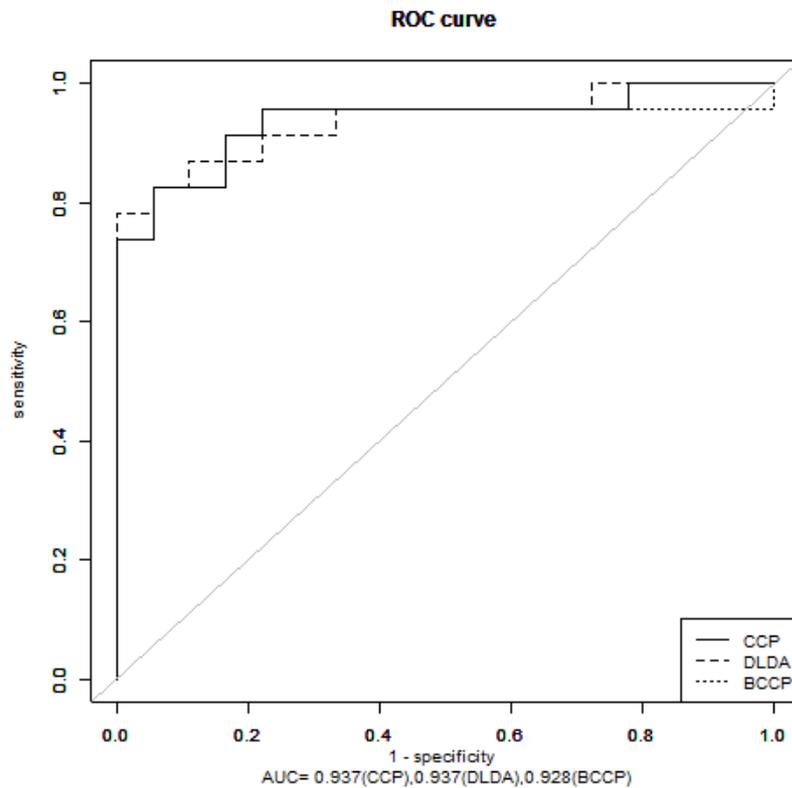
Figura 70. Curva ROC del modelo de 5 genes con el modelo DLDA.



**Figura 71. Curva ROC del modelo de 5 genes con el modelo CCP.**



**Figura 72. Curva ROC del modelo de 5 genes con el modelo BCCP.**



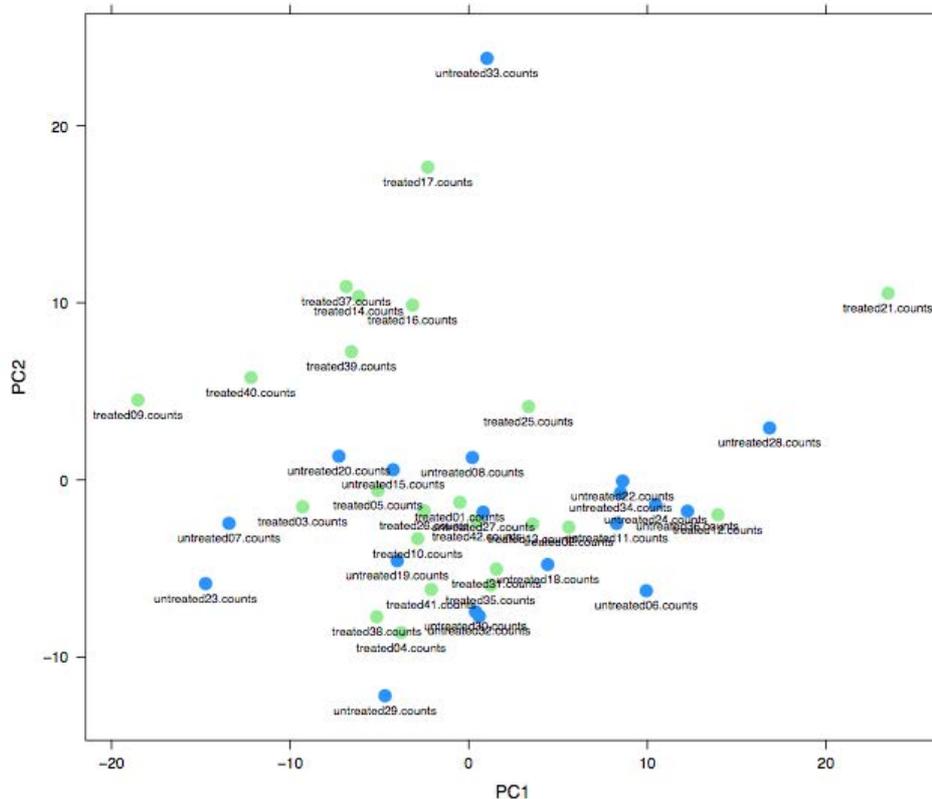
**Figura 73. Curva ROC del modelo de 5 genes con los modelos CCP, DLDA y BCCP.**

Tras comparar los tres modelos (Tabla 97), utilizamos finalmente el modelo DLDA:

<b>Tabla 97. AUC de las curvas ROC según el modelo utilizado</b>	
<b>Modelo</b>	<b>AUC</b>
<b>DLDA</b>	<b>0,937</b>
<b>CCP</b>	<b>0,937</b>
<b>BCCP</b>	<b>0,928</b>

El siguiente paso fue caracterizar estos cinco genes en las bases de datos conocidas (Genecard), donde solo identificamos dos genes: EDEM3 (ENSG000000116406) y LINC01433 (ENSG000000230176). Los otros tres quedaron sin asignación.

Para determinar la capacidad pronostica de recaída de EDEM3 y LINC01433, realizamos un diagrama de dispersión (Figura 74) donde observamos cómo, salvo un paciente, la práctica totalidad de pacientes del grupo no recaída (azul) se agrupaban en una misma área. Por el contrario, los pacientes del grupo recaída (verde) presentaban un grado de dispersión mucho mayor con dos áreas más definidas.



**Figura 74. Gráfica de componentes principales para todos los pacientes de la fase de exploración. Azul: pacientes grupo no recaída. Verde: pacientes grupo recaída.**

#### **4.2.2. Fase de confirmación**

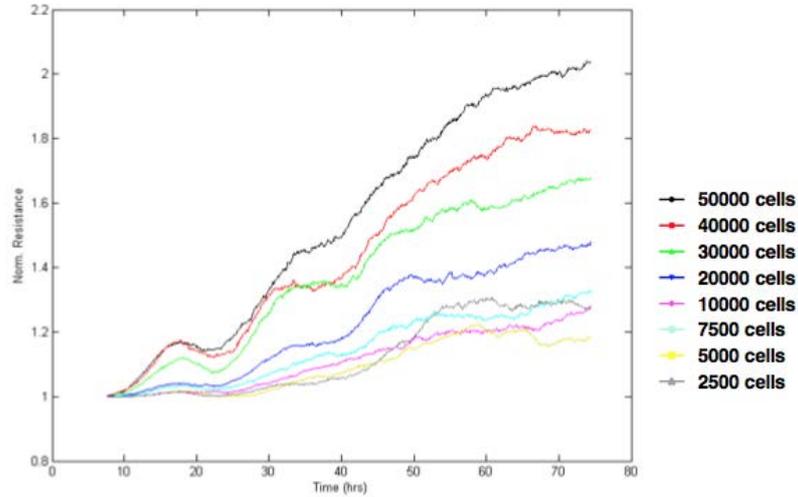
Ya que los genes EDEM3 y LINC01433 no están bien caracterizados en la bibliografía, se hizo un estudio para intentar entender mejor su contribución a la evolución del LARC.

##### **4.2.2.1. Análisis de la proliferación celular**

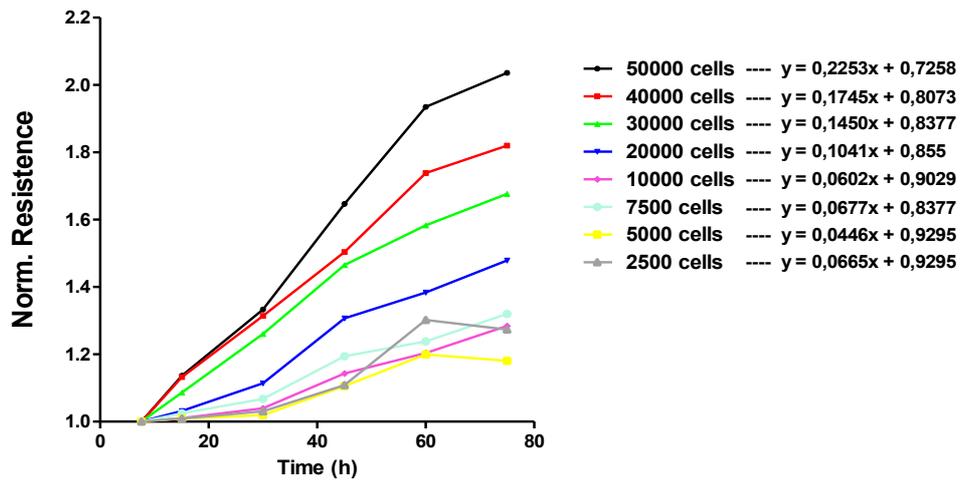
###### **4.2.2.1.1. Análisis por ECIS de las células HCT-116**

La línea celular HCT-116 fue seleccionada ya que se obtuvo a partir de un cáncer de colon humano. Para determinar el número de células necesarias para los experimentos posteriores, se sembraron distintas cantidades de células en los pocillos del sistema ECIS (Figura 75).

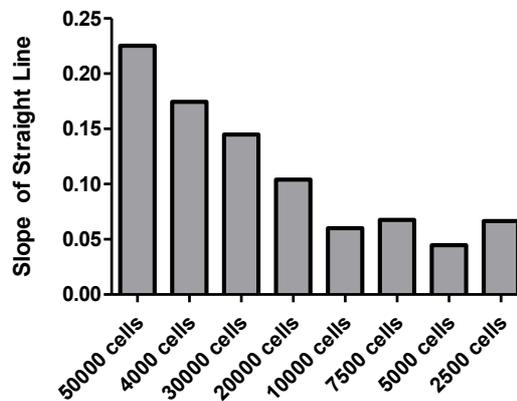
Con los datos numéricos obtenidos, calculamos la ecuación lineal más representativa para estos crecimientos (Figura 76) y, a partir de ella, se calcularon las pendientes de las rectas (Figura 77) para decidir la cantidad de células para nuestros estudios de proliferación y migración. Escogimos 50.000 células ya que presentan una proliferación más rápida y fácil de seguir.



**Figura 75. Proliferación de HCT-116 extrapolada a partir de la resistencia medida por ECIS según el número de células de partida.**



**Figura 76. Ensayo de proliferación por ECIS de la línea celular HCT-116. Efecto según número de células.**



**Figura 77. Pendientes de las rectas según el inóculo inicial.**

## 4.2.2.2. Análisis del gen EDEM3

### 4.2.2.2.1. Proliferación celular

Para determinar la influencia del gen EDEM3, se generó un mutante donde este gen se silenció por la técnica CRISPR (colonia CRISPR-EDEM3-4.1). Cuando se analizó la proliferación celular de este clon, se observó una curva de impedancia más aplanada que la del control no modificado, lo que se traduce en una menor tasa de proliferación temprana (16 horas) (Figura 78).

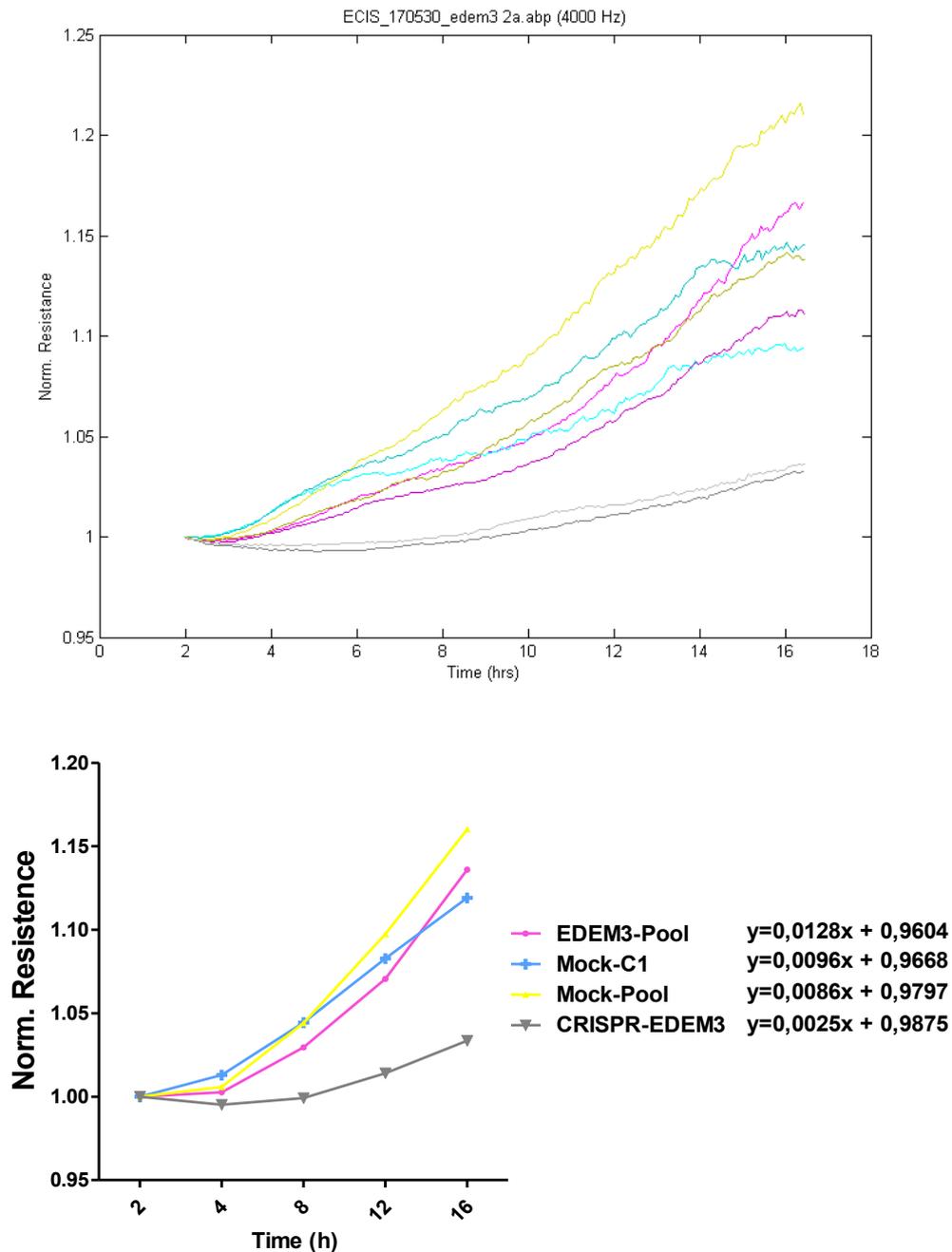
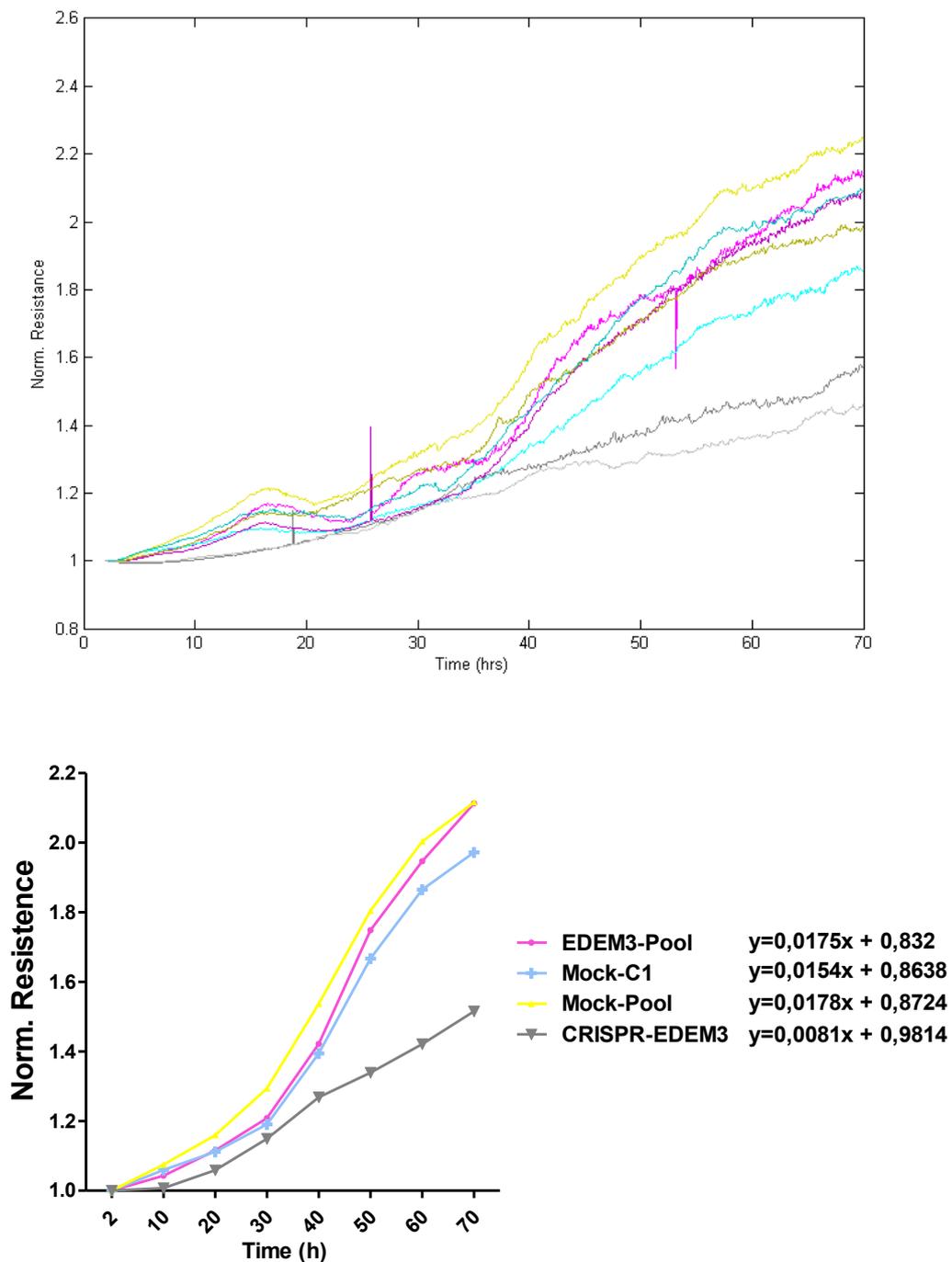


Figura 78. Proliferación celular a corto plazo de las colonias de EDEM3 (rosa), del vector vacío (amarillo/azul) y el CRISPR-EDEM3 (grises)

En la gráfica de proliferación a más largo tiempo (70 horas) observamos que las células con el gen EDEM3 aumentan su velocidad de crecimiento una vez se adaptan al medio, aproximadamente entre las 30-50h, para volver posteriormente a su velocidad normal. Esta curva de morfología ondulante no se produce en las colonias de CRISPR, que además de presentar una proliferación menor, siguen un patrón distinto (Figura 79).



**Figura 79. Proliferación celular de las colonias de EDEM3 (rosa) del vector vacío (amarillo/azul) y el CRISPR-EDEM3 (grises) medido hasta 70 horas.**

#### 4.2.2.2.2. Migración celular

En el ensayo para migración celular obtuvimos un patrón similar al obtenido en el análisis de proliferación, demostrándose que las células a las que se les silencia el gen EDEM3 tienen una menor capacidad de migración celular (Figura 80).

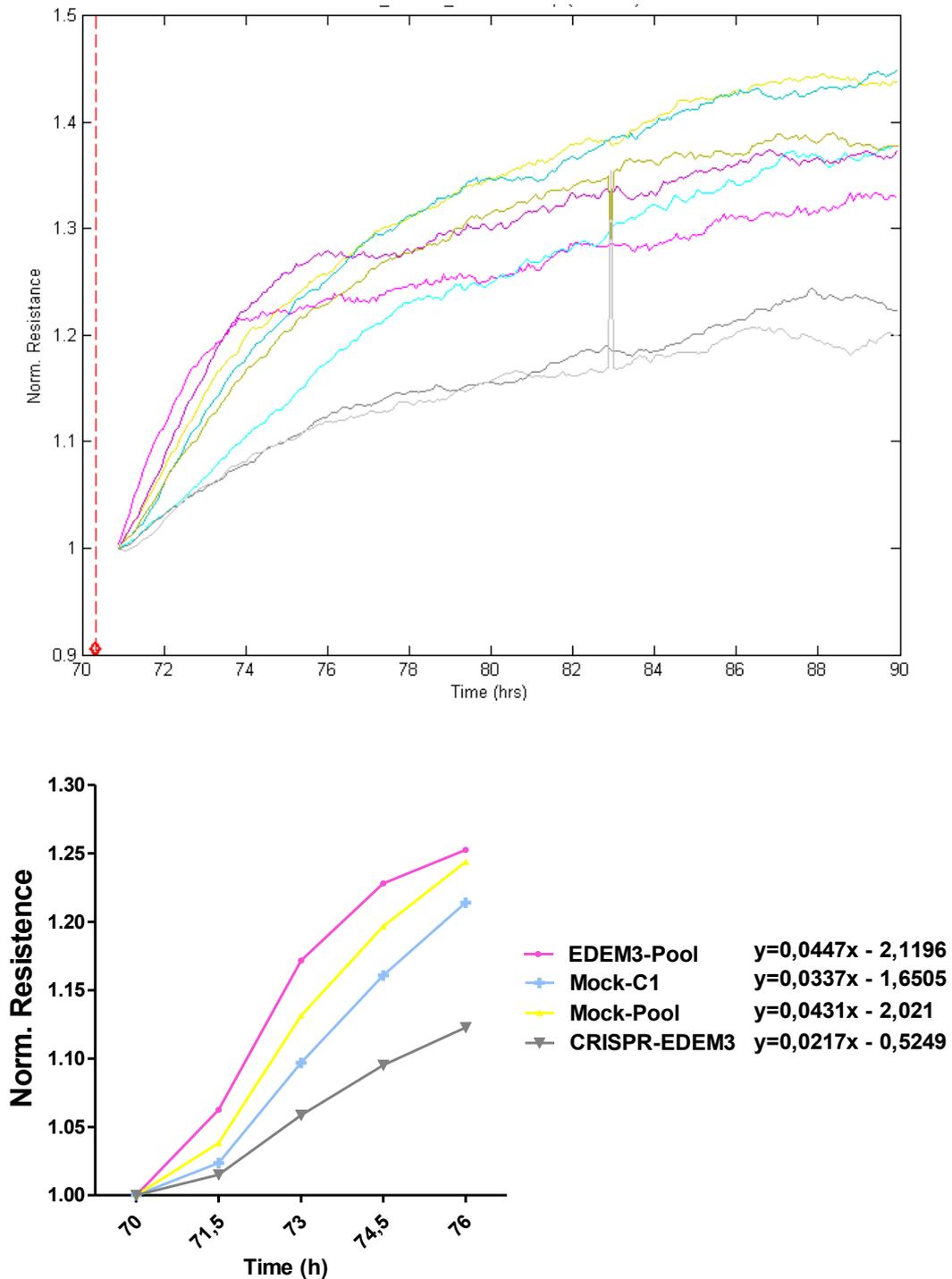
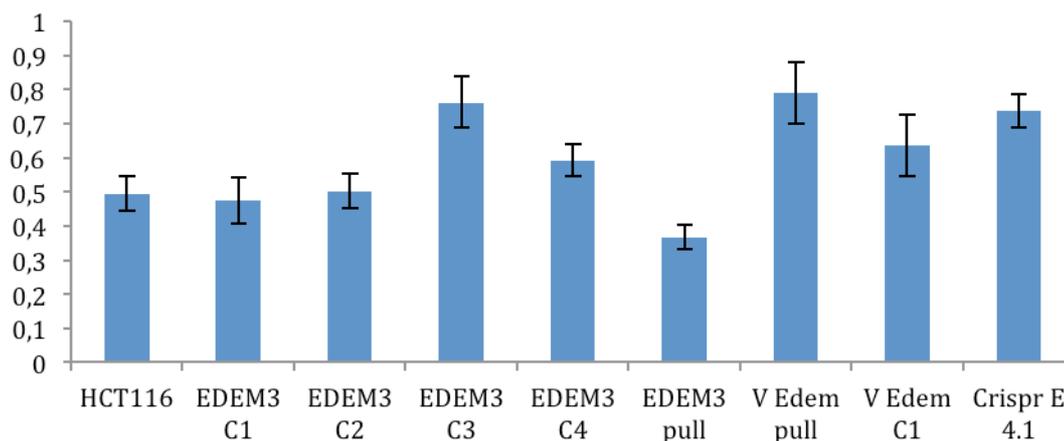


Figura 80. Respuesta celular de migración tras el pulso eléctrico.  
CRISPR (grises), Mock (azul/amarillo) y EDEM3 (rosa).

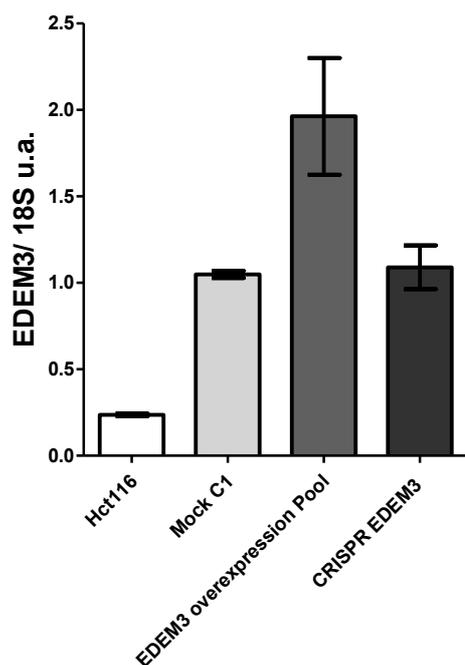
#### 4.2.2.2.3. Análisis de EDEM3 por MTT y qRT-PCR

También analizamos por MTT la capacidad proliferativa de las líneas silenciadas para EDEM3 obteniendo resultados contradictorios (Figura 81), ya que según lo observado en el ECIS tendríamos que haber obtenido una menor actividad mitocondrial, es decir un menor número de células viables en el vector de silenciamiento (CRISPR-EDEM3-4.1), algo que no se observó (como puede apreciarse en la gráfica). Además, a priori, el vector vacío debería tener valores similares a las células sin transfectar (HCT-116).



**Figura 81. Gráfica del ensayo MTT para el gen EDEM3.**

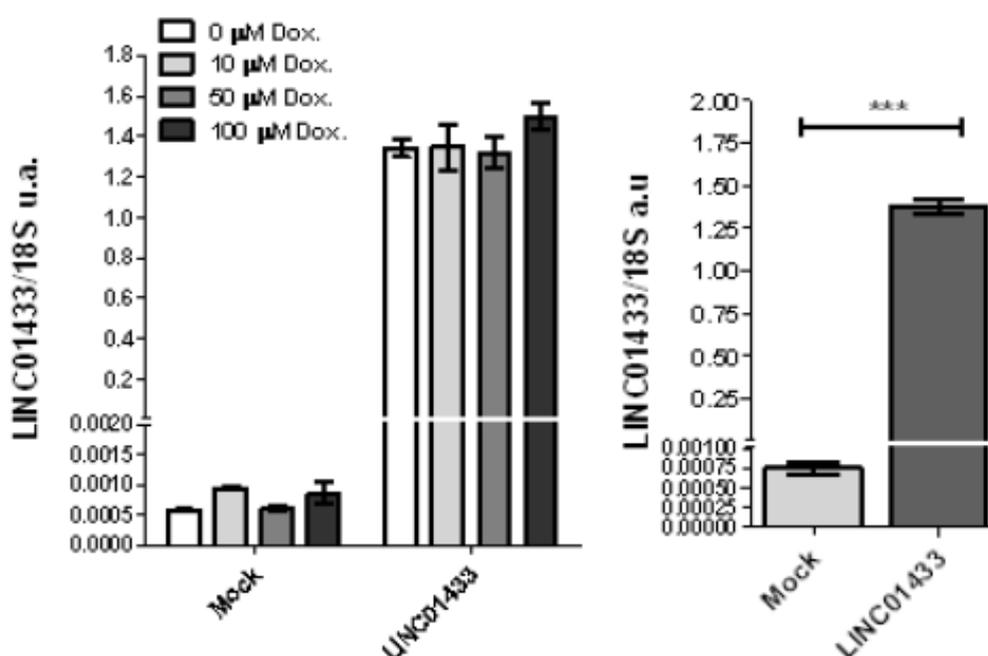
Para estudiar la expresión génica, analizamos EDEM3 con qRT-PCR (Figura 82) obteniendo una mayor expresión de EDEM3 en las células transfectadas con el vector vacío (Mock). Como era esperable, la transfección con el sistema CRISPR no alteró la expresión del RNA para EDEM3.



**Figura 82. Expresión de EDEM3 por qRT-PCR en células sin transformar (HCT116), células transformadas con el vector vacío (Mock), con el vector que sobreexpresa EDEM3 y con el CRISPR.**

#### 4.2.2.3. Análisis del gen LINC01433

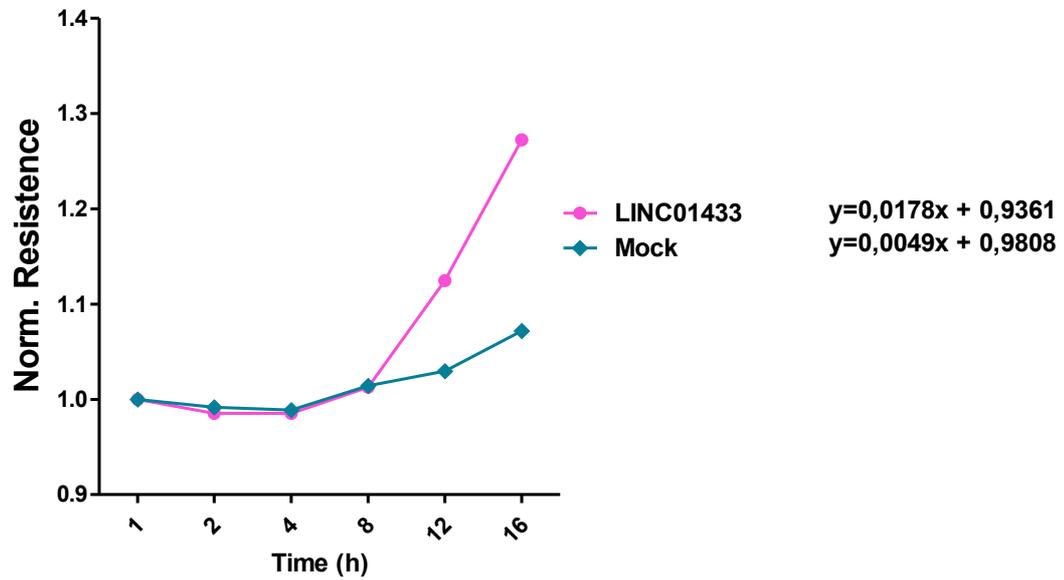
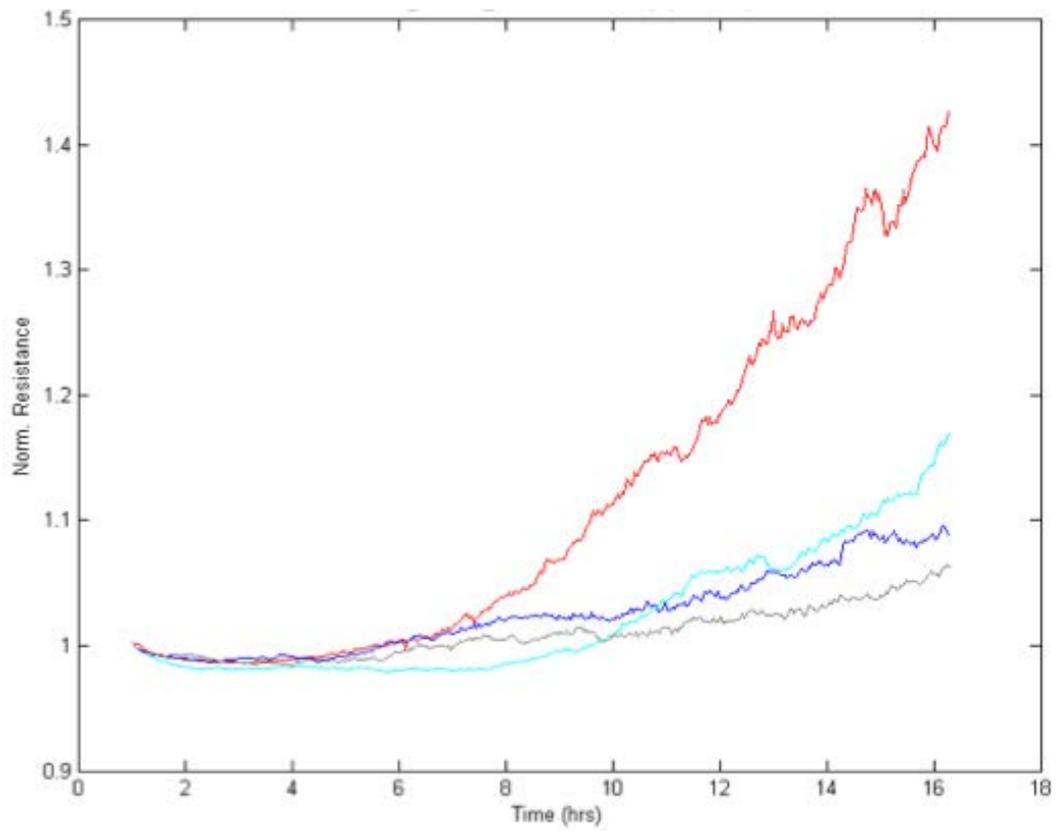
Para el estudio del gen LINC01433 se realizó un ensayo por PCR cuantitativa (qRT-PCR) para determinar la expresión del gen por sobreexpresión tras el tratamiento con diferentes concentraciones de doxiciclina y el ECIS para comprobar la proliferación y migración celular en los vectores con el gen y del vector vacío. Desafortunadamente no fue posible generar a tiempo líneas con el gen silenciado mediante CRISPR/CAS9. En el análisis de los resultados de la qRT-PCR de LINC01433 objetivamos una muy baja expresión de este gen en las células con el vector vacío (Mock), mientras que en el vector de sobreexpresión se demostraba una expresión mucho más elevada (Figura 83).



*Figura 83. Gráfico de amplificación del gen LINC01344 y el vector vacío a distintas concentraciones de doxiciclina.*

#### 4.2.2.3.1. Proliferación celular

En el ensayo por ECIS con el vector vacío y las células que sobreexpresan el gen LINC01344 se observó que estas últimas tienen una mayor tasa de proliferación temprana a 16 horas que las células control (Figura 84).



**Figura 84. Proliferación celular temprana con el vector vacío y con la sobreexpresión del gen LINC01433. Arriba: LINC01433 S1 (rojo) MockS1 (azul claro), LINC01433 S2 (gris oscuro) y Mock S2 (azul oscuro).**

Este mismo patrón de comportamiento puede observarse cuando la medición se realiza Podemos a tiempos más largos (60 horas) (Figura 85).

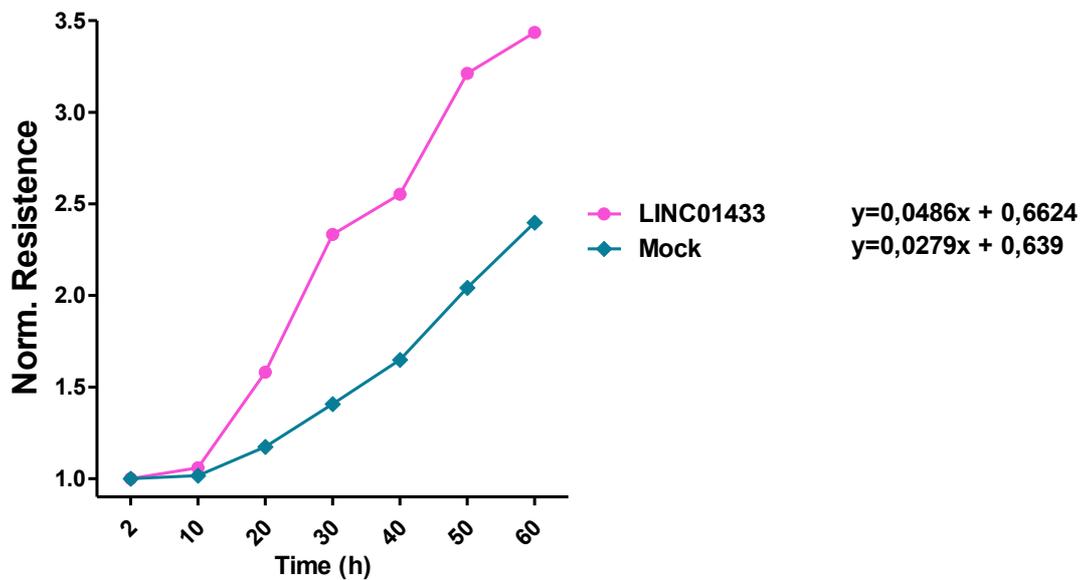
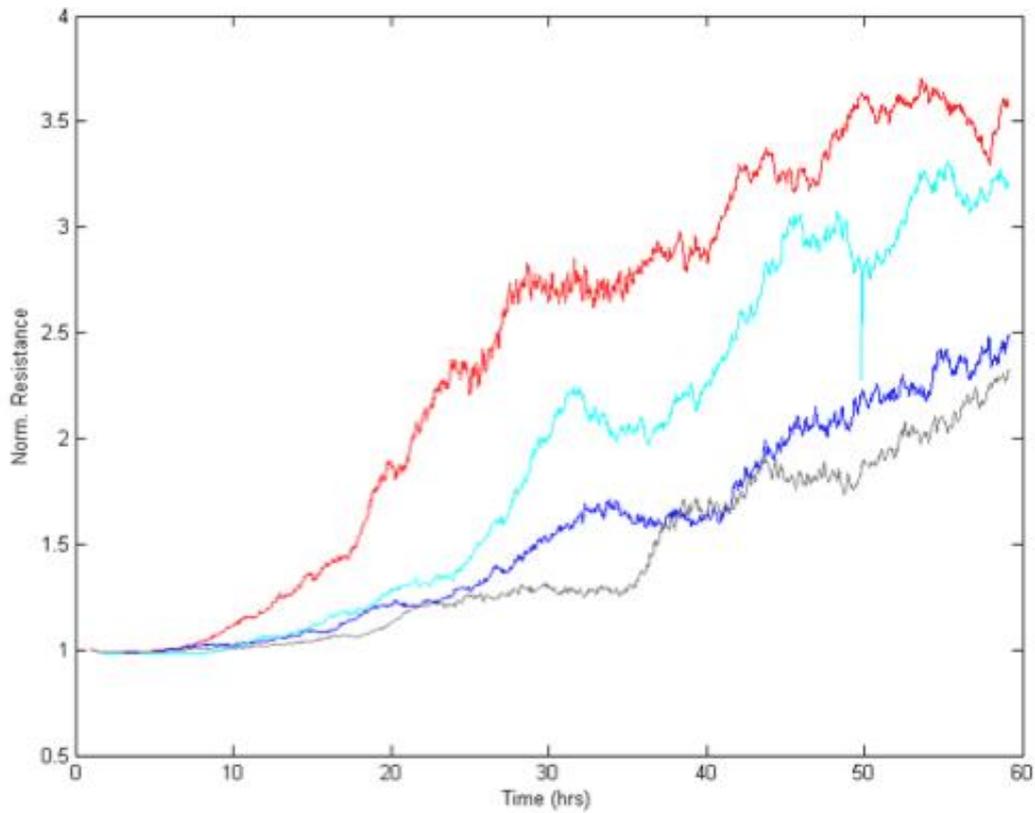


Figura 85. Respuesta de proliferación a 60 horas. Arriba: LINC01433 S1 (rojo) MockS1 (azul claro), LINC01433 S2 (gris oscuro) y Mock S2 (azul oscuro).

#### 4.2.2.3.2. Migración celular

También comprobamos cómo tras el pulso eléctrico se objetiva una rápida recuperación de las células con altos niveles de LINC01433, lo que se traduce en una mayor tasa de migración (Figura 86),

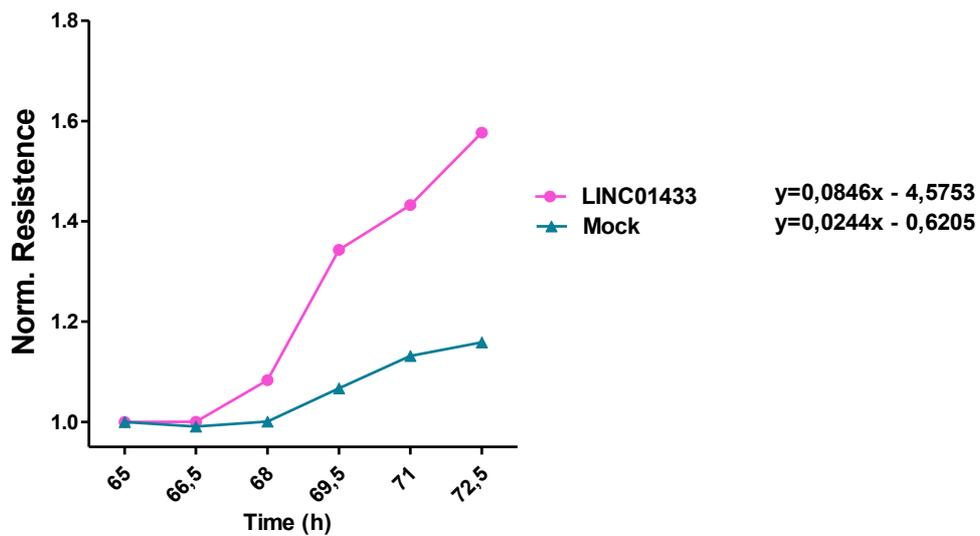
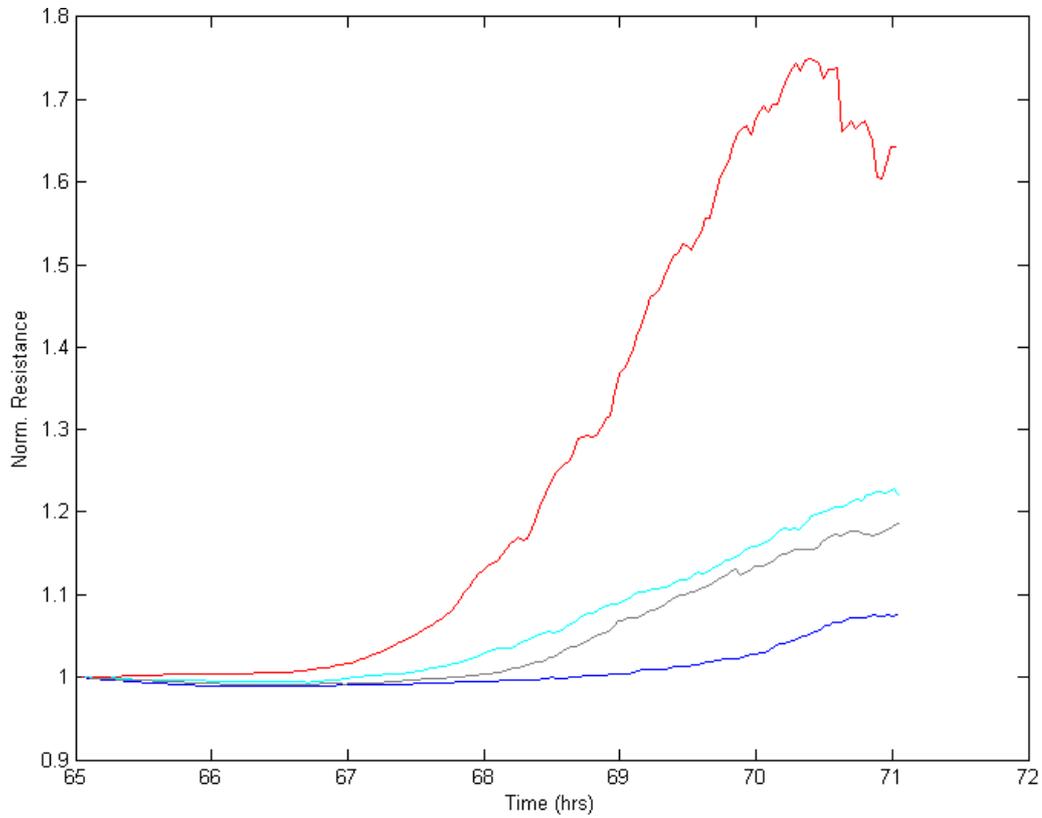
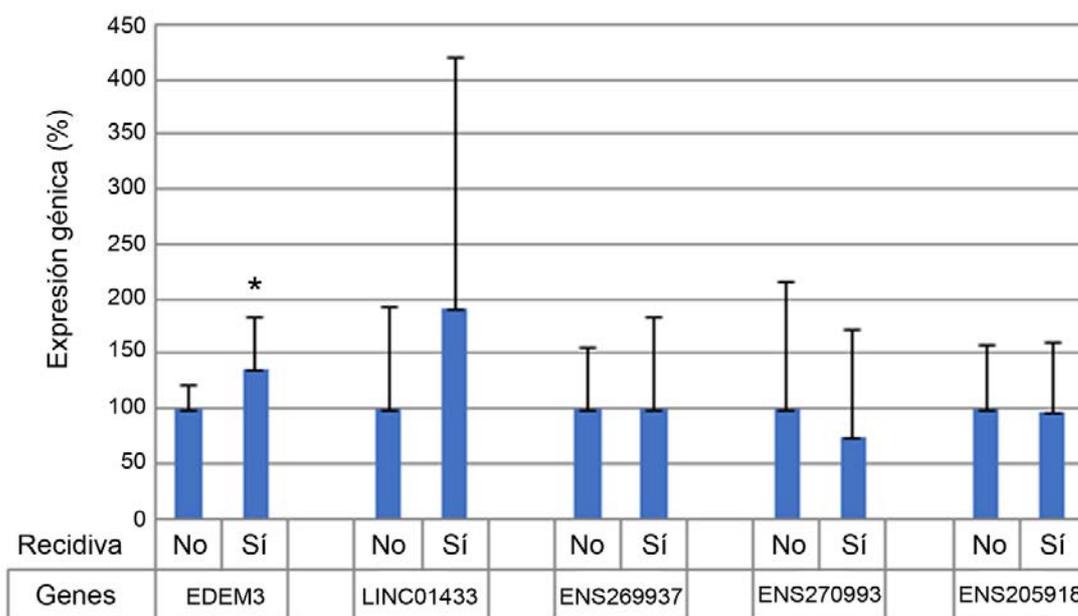


Figura 86. Respuesta de migración del gen LINC01433 tras el pulso eléctrico. Arriba LINC01433 S1 (rojo) MockS1 (azul claro), LINC01433 S2 (gris oscuro) y Mock S2 (azul oscuro).

### 4.2.3. Fase de validación

De las 51 muestras obtenidas, únicamente se pudieron analizar 36 (9 de pacientes que habían recaído y 27 pacientes sin recaída) debido a problemas técnicos por la calidad de conservación de las biopsias en los bloques de parafina.

En el análisis por ultrasecuenciación masiva, encontramos que EDEM3 siguió manteniendo su sobreexpresión significativamente ( $p = 0,026$ ), pero los otros cuatro genes no manifestaron diferencias significativas (Figura 87). Por lo tanto, el patrón con los 5 genes no pudo validarse.



**Figura 87. Expresión génica para los 5 genes seleccionados en la primera fase del proyecto y estudiados en la cohorte de validación. Únicamente encontramos diferencias significativas ( $p=0,026$ ) para EDEM3. Para los demás genes no se hallaron diferencias significativas.**

### 4.2.4. Fase de análisis

En esta fase analizamos el conjunto de las 77 muestras sometidas a NGS (41 de la primera ronda y 36 de la segunda). Los resultados de este análisis fueron publicados recientemente (533) y se presentan en el Anexo V.

#### 4.2.4.1. Análisis de factores pronósticos

Para evaluar la capacidad pronóstica de las variables recogidas en nuestra muestra, la dividimos en dos grupos de acuerdo a la presencia o no de recaída a lo largo del seguimiento. En el análisis univariante de las variables al diagnóstico y hasta la cirugía (Tabla 98) encontramos que únicamente el grado tumoral pobremente diferenciado (G3) y las mutaciones en KRAS presentaban significación estadística.

<b>Tabla 98. Análisis univariante de las variables al diagnóstico y hasta la cirugía.</b>			
<b>Factor</b>	<b>Grupo recaída</b>	<b>Grupo no recaída</b>	<b>p-valor</b>
Nº de pacientes, n (%)	31 (40)	46 (60)	
Edad al diagnóstico (media/dt)	63,5/9,5	61,7/10,5	0,445
Hombres/Mujeres (n)	23/8	34/12	1,000
HSP/FHC (n)	26/5	43/3	0,256
cT2N1, n (%)	2 (6,5)	2 (4,3)	1,000
cT3N0, n (%)	11 (35,5)	19 (41,3)	0,642
cT3N1, n (%)	13 (41,9)	20 (43,5)	1,000
cT3N2, n (%)	1 (3,2)	4 (8,7)	0,643
cT4N0, n (%)	1 (3,2)	1 (2,2)	1,000
cT4N1, n (%)	1 (3,2)	0	0,403
cT4N2, n (%)	2 (6,5)	0	0,159
Estadio cTNM>T3N0, n (%)	18 (58,1)	25 (54,3)	0,817
G1 pre, n (%)	2 (6,5)	6 (13)	0,463
G2 pre, n (%)	21 (67,7)	37 (80,4)	0,282
G3 pre, n (%)	8 (25,8)	3 (6,5)	<b>0,023</b>
MSI, n (%)	2 (22)	7 (78)	0,301
Mutaciones en KRAS, n (%)	12 (63)	7 (37)	<b>0,028</b>
LARC bajo (0-5cm), n (%)	11 (34)	22 (66)	0,350
LARC medio (6-10cm), n (%)	15 (43)	20 (57)	0,816
LARC superior (11-15cm), n (%)	5 (56)	4 (44)	0,472
Tabaquismo, n (%)	16 (39)	25 (61)	0,821
CEA, ng/mL (media/ds)	14.9/18.3	7.4/13.6	0,057
CA19.9, ng/mL (media/ds)	23,8/25,2	15,6/12,9	0,505
5-FU/LVic, n (%)	20 (64,5)	32 (69,6)	0,804
Capecitabina, n (%)	11 (28,3)	13 (28,3)	0,617
FOLFOX, n (%)	0	1 (2,1)	1,000
DDQRT, días (media/ds)	53.1/18.7	54.3/15.9	0.762

Abreviaturas: HSP: Hospital San Pedro. FHC: Fundación Hospital Calahorra MSI: inestabilidad de microsatélites. LARC: carcinoma de recto localmente avanzado. DDQRT: tiempo transcurrido desde el diagnóstico al inicio de la QRT. ds: desviación típica o estándar.

En el análisis univariante de las variables post-cirugía (Tabla 99) encontramos que el grupo recaída se asociaba con menor tasas de respuesta completa patológica, mayor porcentaje de estadios >T3N0, mayor porcentaje de EMVI, invasión linfática y perineural, afectación ganglionar y mayor número de ganglios positivos.

<b>Tabla 99. Análisis univariante de variables post-cirugía</b>			
<b>Factor</b>	<b>Grupo recaída</b>	<b>Grupo no recaída</b>	<b>p-valor</b>
Nº de pacientes, n (%)	31 (40)	46 (60)	
DQRTCX, días (media/ds)	48.4/9.2	47.6/11.3	0,732
DDCX, días (media/ds)	140.8/22.6	141.2/21.4	0,943
AAP, n (%)	16 (48)	17 (52)	0,236
ypT0N0, n (%)	2 (6,5)	5 (10,9)	0,695
ypT1N0, n (%)	0	6 (13)	0,076
ypT2N0, n (%)	6 (19,4)	16 (34,8)	0,199
ypT2N1, n (%)	2 (6,5)	2 (4,3)	1,000
ypT2N2, n (%)	1 (3,2)	1 (2,2)	1,000
ypT3N0, n (%)	5 (16,1)	11 (23,9)	0,569
ypT3N1, n (%)	5 (16,1)	5 (10,9)	0,512
ypT3N2, n (%)	7 (22,6)	0	<b>0,001</b>
ypT4N0, n (%)	0	0	-
ypT4N1, n (%)	2 (6,5)	0	0,159
ypT4N2, n (%)	1 (3,2)	0	0,403
Estadio ypTNM>T3N0, n (%)	16 (51)	5 (10,8)	<b>&lt;0,001</b>
GRT0, n (%)	2 (29)	5 (71)	0,703
GRT1, n (%)	7 (33)	14 (67)	0,791
GRT2, n (%)	11 (33)	22 (67)	0,630
GRT3, n (%)	8 (62)	5 (38)	0,065
G1 post, n (%)	1 (3,8)	6 (16,7)	0,222
G2 post, n (%)	20 (76,9)	28 (77,8)	1,000
G3 post, n (%)	5 (19,2)	2 (5,6)	0,119
EMVI, n (%)	6 (75)	2 (25)	<b>0,048</b>
Invasión linfática, n (%)	7 (78)	2 (12)	<b>0,023</b>
Invasión perineural, n (%)	13 (87)	2 (13)	<b>&lt;0,001</b>
Afectación ganglionar (ypN+), n (%)	14 (70)	6 (30)	<b>0,001</b>
ypN0, n (%)	15 (51,7)	40 (87)	<b>0,001</b>
ypN1a, n (%)	2 (6,9)	2 (4,3)	0,638
ypN1b, n (%)	5 (17,2)	3 (6,5)	0,248
ypN2a, n (%)	3 (10,2)	0	0,054
ypN2b, n (%)	4 (13,8)	1 (2,2)	0,070
Nº ganglios positivos (media/ds)	3/5.8	0.3/1.2	0,001
Nº ganglios resecaados (media/ds)	10.0/7.0	8.8/5.5	0,600

Abreviaturas: DQRTCX: tiempo fin de QRT - cirugía. DDCX: tiempo diagnóstico - cirugía. AAP: amputación abdomino-perineal. GRT: grado de regresión tumoral. EMVI: invasión vascular extramural. ds: desviación típica o estándar.

En el análisis univariante de las variables relacionadas con la QT adyuvante (Tabla 100) encontramos diferencias estadísticamente significativas en el tipo de QT utilizada. El grupo recaída recibió más QT basada en fluoropirimidinas y oxaliplatino y el no recaída con fluoropirimidinas en monoterapia ( $p = 0,038$ ).

<b>Tabla 100. Análisis univariante variables QT adyuvante.</b>			
<b>Factor</b>	<b>Grupo recaída</b>	<b>Grupo no recaída</b>	<b>p-valor</b>
Número de pacientes, n (%)	31 (40)	46 (60)	
DCXQT, días (media/ds)	59.7/38.0	46.33/17.1	0,112
QT adyuvante, n (%)	23 (74,2)	43 (93,5)	<b>0,023</b>
5FU/LV, n (%)	3 (13)	19 (44,2)	<b>0,014</b>
Capecitabina, n (%)	4 (17,4)	7 (16,3)	1,000
FOLFOX, n (%)	12 (52,2)	10 (23,3)	<b>0,028</b>
XELOX, n (%)	4 (17,4)	7 (16,3)	1,000
QT solo fluoropirimidinas, n (%)	7 (30,4)	26 (60,5%)	<b>0,038</b>
QT con oxaliplatino, n (%)	16 (69,6%)	17 (39,5%)	<b>0,038</b>

Abreviaturas: DCXQT: tiempo cirugía - QT adyuvante. 5FU: 5-Fluorouracilo. EMVI: invasión vascular extramural.  
Diferencias estadísticamente significativas en azul.

En el análisis univariante de los parámetros hematológicos no encontramos diferencias estadísticas entre las ratios (Tabla 101), pero sí en los niveles de hemoglobina 2 (Hb2) y hemoglobina 3 (Hb3) ( $p = 0,032$  y  $p = 0,003$  respectivamente) (Tablas 101 y 102).

<b>Tabla 101. Análisis univariante de los ratios hematológicos.</b>			
	<b>Grupo recaída</b>	<b>Grupo no recaída</b>	<b>p-valor</b>
Ratio Neutrófilo/Linfocito 1 (media/ds)	2,5	2,2	0,118
Ratio Neutrófilo/Linfocito 2 (media/ds)	5,8	3,8	0,075
Ratio Neutrófilo/Linfocito 3 (media/ds)	5,9	6,4	0,912
Ratio Neutrófilo/Linfocito 4 (media/ds)	3,8	3,5	0,503
Ratio Linfocito/Monocito 1 (media/ds)	3,5	3,8	0,448
Ratio Linfocito/Monocito 2 (media/ds)	1,5	2,2	<b>0,011</b>
Ratio Linfocito/Monocito 3 (media/ds)	1,8	1,8	0,956
Ratio Linfocito/Monocito 4 (media/ds)	2,2	2,4	0,786
Ratio Plaquetas/Linfocito 1 (media/ds)	137,8	117,9	0,206
Ratio Plaquetas/Linfocito 2 (media/ds)	386,2	236,4	<b>0,029</b>
Ratio Plaquetas/Linfocito 3 (media/ds)	386,3	331,5	0,238

**Tabla 102. Análisis univariante de los parámetros hematológicos.**

	Grupo recaída	Grupo no recaída	p-valor
Leucocitos 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	8146,0	7697,5	0,930
Leucocitos 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	5927,1	5195,5	0,781
Leucocitos 3 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	6448,1	6733,3	0,754
Leucocitos 4 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	5305	5488,1	0,694
Neutrófilos 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	5124,6	4500	0,493
Neutrófilos 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	4262,5	3364,4	0,812
Neutrófilos 3 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	4576,6	4912,1	0,839
Neutrófilos 4 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	3555	3590,4	0,898
Linfocitos 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	2140	2300	0,437
Linfocitos 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	859,2	1051,1	0,076
Linfocitos 3 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	1007,0	1004,0	0,981
Linfocitos 4 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	1070	1178,5	0,395
Monocitos 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	654,6	630	0,746
Monocitos 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	599,6	520	0,267
Monocitos 3 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	592,2	579,0	0,433
Monocitos 4 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	490	535,7	0,451
Hemoglobina 1 (media/ds), g/dL	13,3	14,1	0,055
Hemoglobina 2 (media/ds), g/dL	12,5	13,5	<b>0,008</b>
Hemoglobina 3 (media/ds), g/dL	10,9	11,9	<b>0,007</b>
Hemoglobina 4 (media/ds), g/dL	13,4	13,4	0,792
Plaquetas 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	267285,7	238700	0,231
Plaquetas 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	264428,5	206844,4	0,200
Plaquetas 3 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	326851,8	272285,7	0,176
Plaquetas 4 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	205100	201119,0	0,834

Rangos de normalidad: leucocitos: 4.000 – 10.000; Neutrófilos: 1.900 – 8.000; linfocitos: 900 – 5.200; monocitos:– 1.000.; hemoglobina: 13,5g/dL– 17,5g/dL; plaquetas: 150.000 – 425.000.

En el análisis univariante de las variables bioquímicas (Tabla 103) no encontramos diferencias estadísticamente significativas con ninguna variable.

<b>Tabla 103. Análisis univariante de los parámetros bioquímicos al diagnóstico.</b>			
	<b>Grupo recaída</b>	<b>Grupo no recaída</b>	<b>p-valor</b>
Número de pacientes, n (%)	31 (40)	46 (60)	
Glucosa (media/ds), mg/dL.	111,2	113,3	0,546
Urea (media/ds), mg/dL.	37,0	35	0,529
Creatinina (media/ds), mg/dL.	0,8	0,8	0,730
Ácido úrico (media/ds), mg/dL.	5,2	5,1	0,813
Sodio (media/ds), mEq/L.	142,1	142,2	0,923
Potasio (media/ds), mEq/L.	4,5	4,4	0,350
Triglicéridos (media/ds), mg/dL.	109,6	104	0,651
Colesterol total (media/ds), mg/dL.	19	203,5	0,513
HDL-Colesterol (media/ds), mg/dL.	52	54,6	0,740
LDL-Colesterol (media/ds), mg/dL.	115,7	118,9	0,839
LDH (media/ds), U/L.	276,2	253,9	0,407
GOT (media/ds), U/L.	19,3	18,9	0,626
GPT (media/ds), U/L.	17,8	17,3	0,239
GGT (media/ds), U/L.	26,1	38,4	0,588
Bilirrubina (media/ds), mg/dL.	0,5	0,4	0,414
FA (media/ds), U/L.	75,1	86,9	0,485
Ferritina (media/ds), mcg/L.	77,3	166,5	0,025
Hierro (media/ds), mcg/L.	70,1	72,6	0,876
Calcio (media/ds), mg/dL.	13,9	9,5	0,516
Proteínas totales (media/ds), mg/dL.	7,1	7,0	0,545
Albúmina (media/ds), mg/dL.	4,3	4,4	0,964

Rangos de normalidad: glucosa: 70 – 100mg/dL; urea: 10 – 50mg/dL; creatinina: 0,50 – 0,90mg/dL; ácido úrico: mg/dL; sodio: 135 – 148mmol/L; potasio: 3,6 – 5,1 mol/L; triglicéridos: 0 - 200mg/dL; colesterol:100 - 200mg/dL; HDL-CT: 45 - 110mg/dL; LDL-CT: 90 - 160mg/dL; LDH: 120 – 250 U/L; GOT: 0 – 40U/L; GPT: 0 – 40U/L, GGT: 6 – 42U/L; bilirrubina: 0,0 – 1,2mg/dL; FA: 35 – 104U/L; Ferritina: 25 – 310 µcg/dL; Hierro: 34 – 172µg/dL calcio: 8,0 – 11,0mg/dL.; proteínas: 6,2 – 8,4g/dL; albúmina: 3,5 – 4,9g/dL.

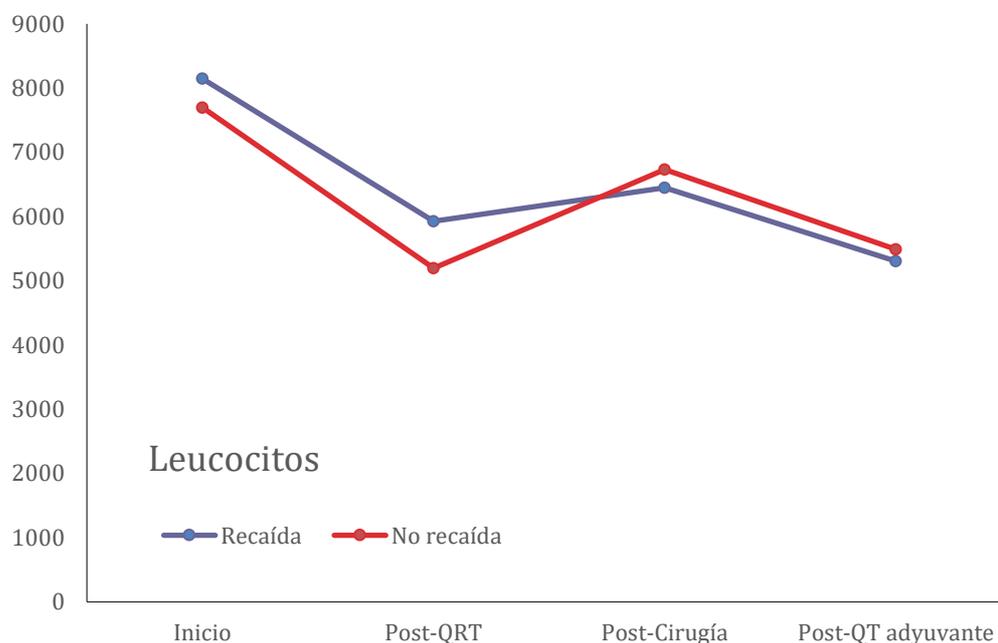
#### 4.2.4.1.1. Cinética de los parámetros hematológicos

Con los datos hematológicos de la muestra, realizamos representación gráfica de las medias de cada parámetro para cada una de las cuatro determinaciones con la idea de describir las tendencias por grupo de cada parámetro según del “*timing*” terapéutico:

- 1) Inicio: 1ª determinación analítica al diagnóstico de la enfermedad.
- 2) Post-QRT: 2ª determinación analítica tras finalizar la QRT neoadyuvante.
- 3) Post-Cirugía: 3ª determinación analítica tras la cirugía.
- 4) Post-QT adyuvante: 4ª determinación analítica tras finalizar la QT adyuvante o en la primera revisión en caso de no realizarse.

##### 4.2.4.1.1.1. Leucocitos

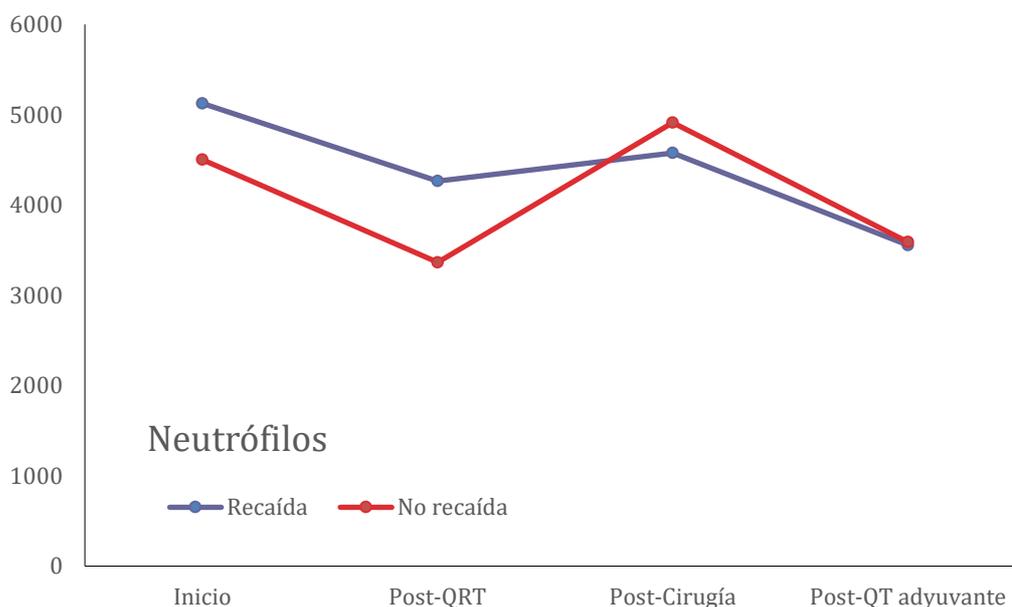
La tendencia de los leucocitos es a disminuir tras la QRT para luego elevarse tras la cirugía y volver a descender tras la QT posterior/seguimiento. El grupo recaída tiene medias superiores hasta después de la QRT e inferiores tras la cirugía (Figura 88).



**Figura 88. Evolución de los niveles de leucocitos (media, c/mm³).**

#### 4.2.4.1.1.2. Neutrófilos

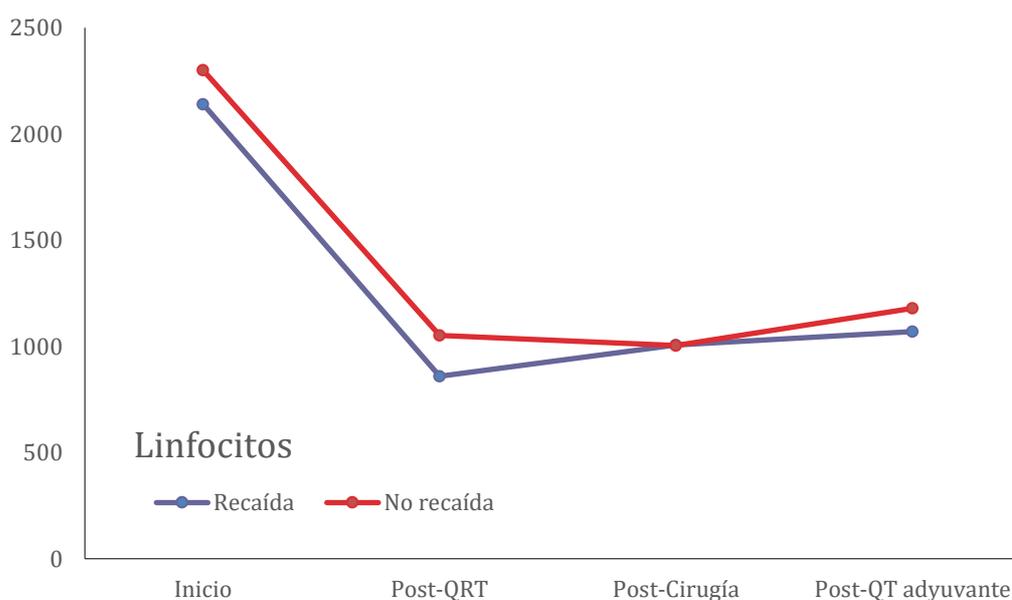
La tendencia de los neutrófilos es similar a la de los leucocitos (Figura 89).



**Figura 89. Evolución de los niveles de neutrófilos (media, c/mm<sup>3</sup>).**

#### 4.2.4.1.1.3. Linfocitos

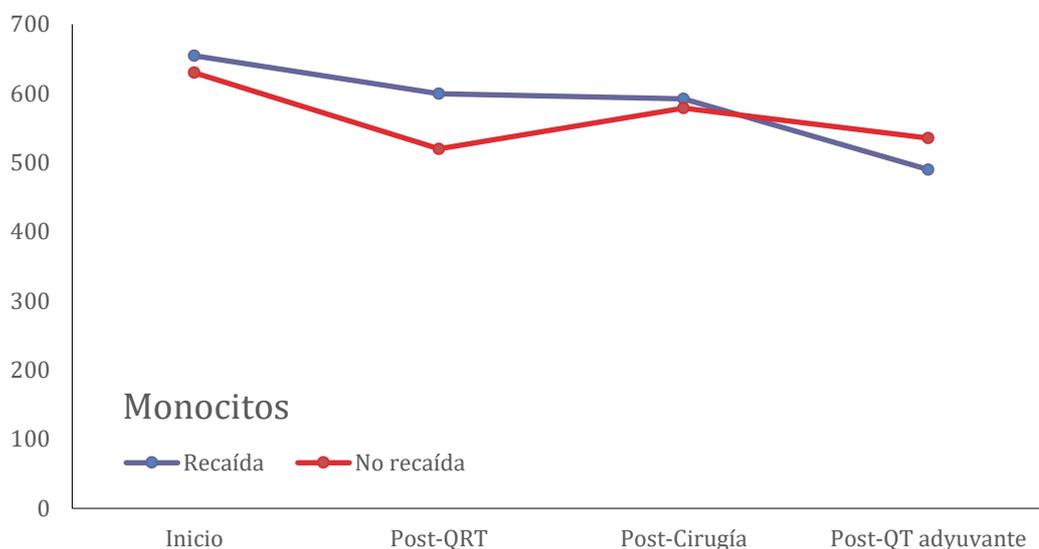
La tendencia de los linfocitos es a disminuir drásticamente tras el tratamiento con la QRT para posteriormente mantenerse en esos mismos niveles a lo largo del tiempo, con una leve tendencia a la recuperación (Figura 90).



**Figura 90. Evolución de los niveles de linfocitos (media, c/mm<sup>3</sup>).**

#### 4.2.4.1.1.4. **Monocitos**

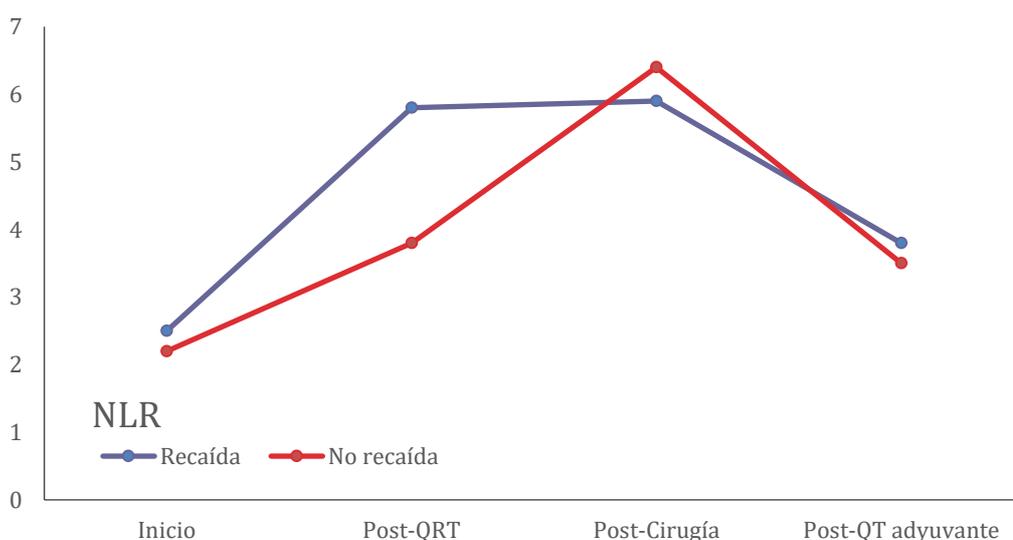
La tendencia global de los monocitos es a mantenerse relativamente constantes a lo largo del tiempo, aunque con una tendencia descendente. El grupo de pacientes sin recaída presentan medias inferiores hasta el fin de la QRT, para igualarse tras la cirugía y posteriormente estar levemente por encima (Figura 91).



**Figura 91. Evolución de los niveles de monocitos (media, c/mm³).**

#### 4.2.4.1.1.5. **Ratio neutrófilo/linfocito (NLR)**

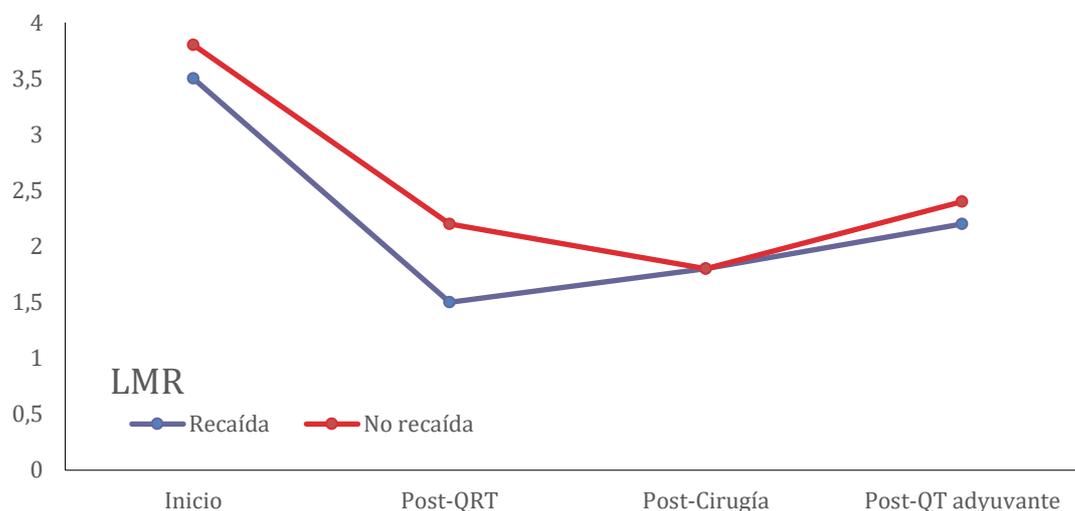
La tendencia del NLR es a aumentar hasta después de la cirugía. A partir de entonces, disminuye hasta buscar sus niveles iniciales. En el grupo de recaída el NLR es superior tras la QRT, para igualarse tras la cirugía y mantener recorridos paralelos (Figura 92).



**Figura 92. Evolución de los niveles de la ratio neutrófilo/linfocito.**

#### 4.2.4.1.1.6. Ratio linfocito/monocito (LMR)

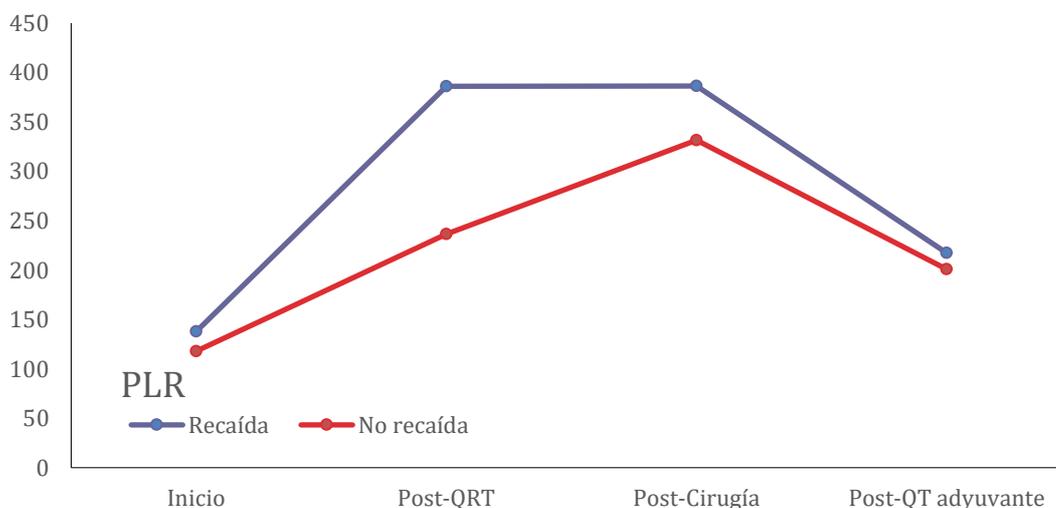
La tendencia del LMR es a disminuir alcanzando el nadir tras la QRT en el grupo recaída y tras la cirugía en el grupo no recaída, para luego ascender de nuevo. Las diferencias en las medias LMR tras la QRT fueron estadísticamente significativas entre ambos grupos con una ratio LMR2 menor en el grupo de recaída ( $p = 0,011$ ) (Figura 93).



**Figura 93. Evolución de los niveles de la ratio linfocito/monocito.**

#### 4.2.4.1.1.7. Ratio plaquetas/linfocitos (PLR)

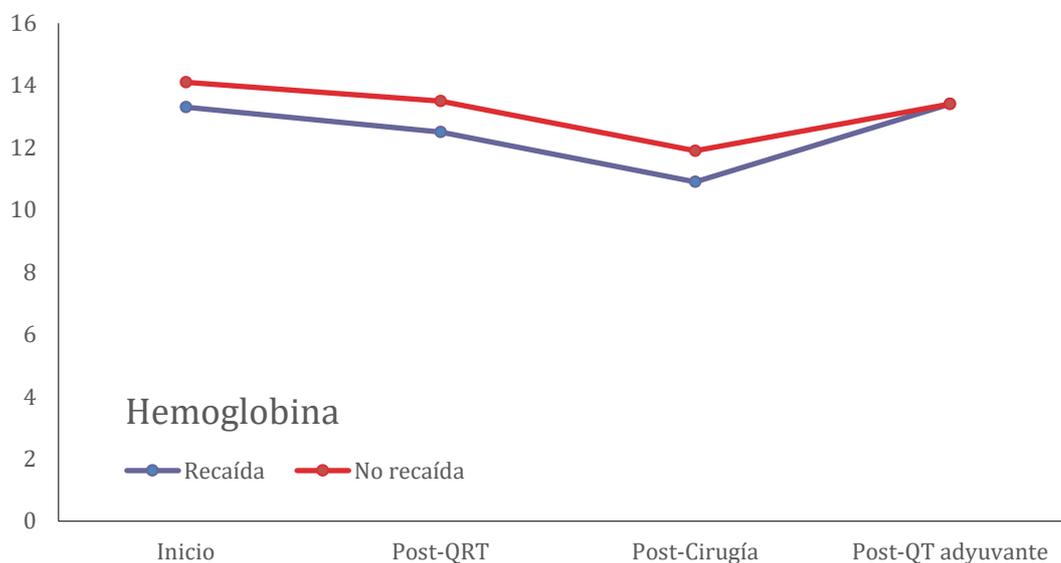
La tendencia del PLR es ascendente hasta alcanzar el cénit tras la QRT en el grupo recaída y tras la cirugía en el grupo no recaída. A partir de entonces, la ratio disminuye. A pesar de tener cinéticas similares, el PLR tras la QRT en el grupo recaída fue significativamente más alto que en el grupo no recaída ( $p = 0,029$ ) (Figura 94).



**Figura 94. Evolución de los niveles de la ratio plaquetas/linfocitos.**

#### 4.2.4.1.1.8. Hemoglobina (Hb)

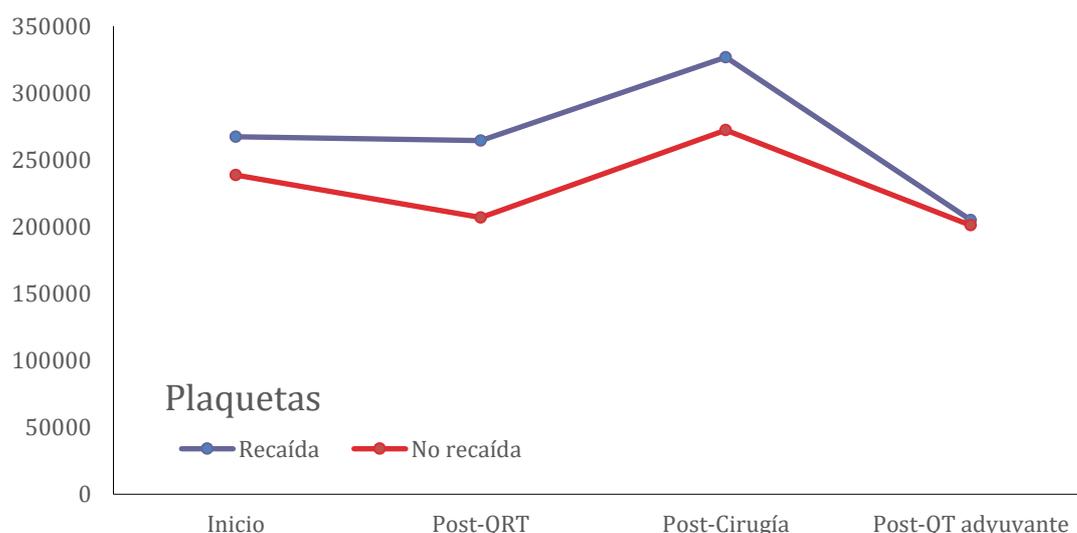
Los niveles de hemoglobina descenden de manera constante para ambos grupos para posteriormente ir recuperándose hasta sus niveles basales. El grupo de recaída parece tener unas medias inferiores al del grupo de no recaída (Figura 95).



**Figura 95. Evolución de los niveles de hemoglobina (media, g/dL).**

#### 4.2.4.1.1.9. Plaquetas

La media de plaquetas sigue una leve tendencia descendente tras la QRT para posteriormente aumentar tras la cirugía y finalmente disminuir a niveles por debajo de los basales tras la QT adyuvante/seguimiento (Figura 96).



**Figura 96. Evolución de los niveles de plaquetas (media, c/mm³).**

#### **4.2.4.1.2. Cálculo del índice de Youden para las variables hematológicas**

En el análisis univariante de las variables hematológicas, objetivamos diferencias estadísticamente significativas únicamente en los niveles de hemoglobina en la segunda (Hb2) y tercera determinación (Hb3), así como en las ratios linfocito/monocito (LMR2) y plaquetas/linfocito (PLR2).

Con la intención de desarrollar un modelo pronóstico, decidimos calcular el punto de corte ideal para cada una de las variables mediante el índice de Youden, que utiliza el valor que posea la mayor sensibilidad y especificidad conjunta de dicha variable, sin tener en cuenta aquellos puntos de corte que por separado tengan mayor sensibilidad y/o especificidad [Índice de Youden = (Sensibilidad + Especificidad) -1).

Para calcular el índice de Youden, utilizamos el método estadístico conocido como curva ROC que, de manera indirecta, también nos proporciona información acerca de la capacidad discriminativa de la variable diagnóstica en estudio. Aunque en las siguientes páginas desarrollaremos el análisis de cada variable, podemos ver en la tabla resumen (Tabla 104) los resultados obtenidos.

<b>Tabla 104. Tabla resumen puntos de corte variables hematológicas.</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Índice de Youden</b>	<b>Punto de corte</b>
Hb2	82,2%	42,1%	0,251	12,3 g/dL
Hb3	63,5%	71,9%	0,354	11,45 g/dL
LMR2	32,7%	87,9%	0,206	2,26
PLR2	78%	40%	0,188	192,84

#### 4.2.4.1.2.1. Cálculo del índice de Youden para la Hemoglobina 2 (Hb2)

La curva ROC para la variable hemoglobina 2 (Figura 97) demostró poca capacidad discriminatoria (AUC = 0,65; IC 95 % 0,51 – 0,78; p = 0,003) (Tabla 105). Gracias a la tabla de coordenadas de la curva, determinamos que el punto de corte ideal para Hb2 fue 12,3 g/dL (Tabla 106)

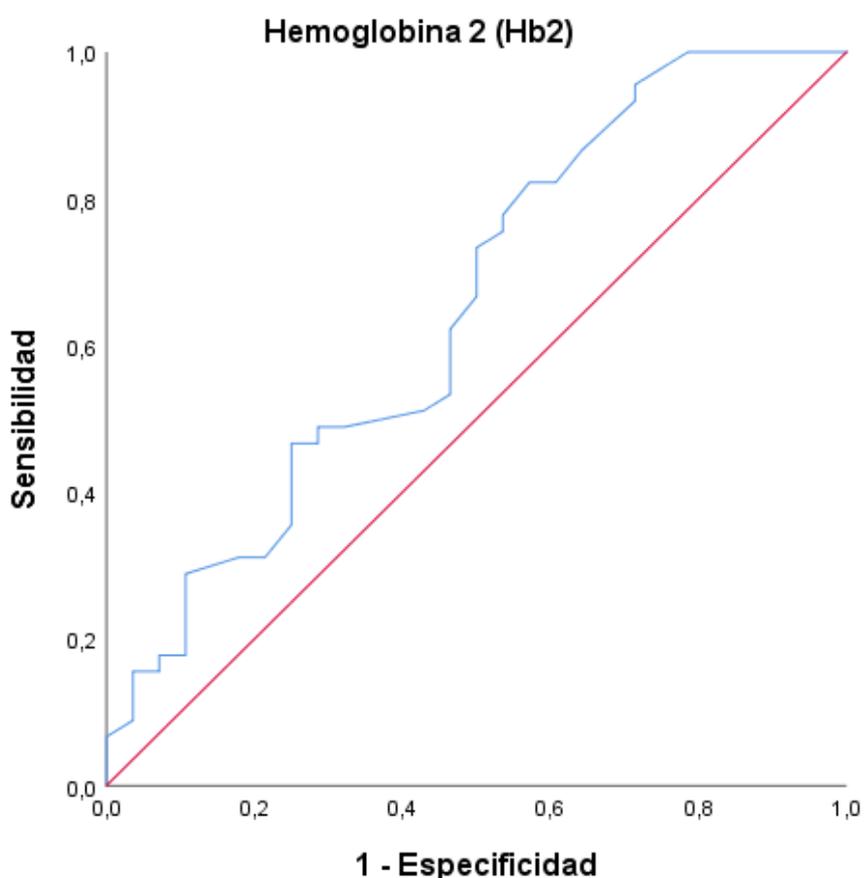


Figura 97. Curva ROC de la variable hemoglobina 2 (Hb2).

<b>Tabla 105. Área bajo la curva de Hb2</b>				
<b>Área</b>	<b>Desv. Error</b>	<b>Significación asintótica</b>	<b>95% de intervalo de confianza</b>	
			<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>
0,652	0,068	0,030	0,519	0,784

**Tabla 106. Sensibilidad, especificidad e índice de Youden  
(en color amarillo) para la hemoglobina 2 (Hb2)**

Hb2	TVP	TFP	TVN	Youden Index
	Sensibilidad	1 - Especificidad	Especificidad	
6,800	1,000	1,000	0,000	0,000
8,850	1,000	0,964	0,036	0,036
10,150	1,000	0,929	0,071	0,071
10,550	1,000	0,893	0,107	0,107
10,750	1,000	0,821	0,179	0,179
11,100	1,000	0,786	0,214	0,214
11,450	0,978	0,750	0,250	0,228
11,600	0,956	0,714	0,286	0,241
11,750	0,933	0,714	0,286	0,219
11,950	0,867	0,643	0,357	0,224
12,150	0,822	0,607	0,393	0,215
<b>12,300</b>	<b>0,822</b>	<b>0,571</b>	<b>0,429</b>	<b>0,251</b>
12,450	0,778	0,536	0,464	0,242
12,550	0,756	0,536	0,464	0,220
12,650	0,733	0,500	0,500	0,233
12,750	0,689	0,500	0,500	0,189
12,850	0,667	0,500	0,500	0,167
12,950	0,622	0,464	0,536	0,158
13,050	0,600	0,464	0,536	0,136
13,150	0,578	0,464	0,536	0,113
13,250	0,533	0,464	0,536	0,069
13,350	0,511	0,429	0,571	0,083
13,450	0,489	0,321	0,679	0,167
13,550	0,489	0,286	0,714	0,203
13,650	0,467	0,286	0,714	0,181
13,750	0,467	0,250	0,750	0,217
13,850	0,422	0,250	0,750	0,172
13,950	0,378	0,250	0,750	0,128
14,050	0,356	0,250	0,750	0,106
14,150	0,311	0,214	0,786	0,097
14,250	0,311	0,179	0,821	0,133
14,400	0,289	0,107	0,893	0,182
14,550	0,267	0,107	0,893	0,160
14,650	0,200	0,107	0,893	0,093
14,750	0,178	0,107	0,893	0,071
14,850	0,178	0,071	0,929	0,106
15,000	0,156	0,071	0,929	0,084
15,150	0,156	0,036	0,964	0,120
15,250	0,111	0,036	0,964	0,075
15,400	0,089	0,036	0,964	0,053
15,600	0,067	0,000	1,000	0,067
16,100	0,044	0,000	1,000	0,044
16,900	0,022	0,000	1,000	0,022
18,300	0,000	0,000	1,000	0,000

#### 4.2.4.1.2.2. Cálculo del índice de Youden para la Hemoglobina 3 (Hb3)

La curva ROC para Hb3 (Figura 98) demostró una mejor capacidad discriminatoria que la Hb2, aunque también insuficiente (AUC = 0,69; IC 95% 0,56 – 0,82; p = 0,007) (Tabla 107). Gracias a la tabla de coordenadas de la curva, determinamos que el punto de corte ideal para Hb2 fue 11,45 g/dL (Tabla 108)

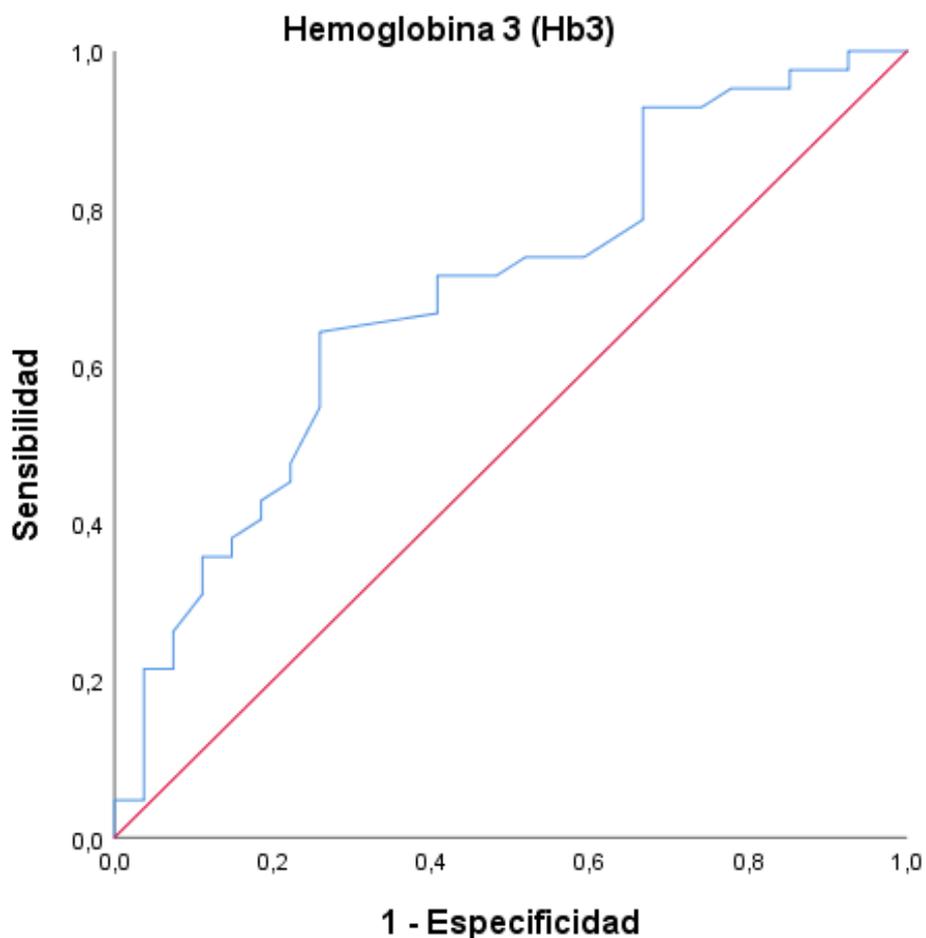


Figura 98. Curva ROC de la variable hemoglobina 3 (Hb3).

Tabla 107. Área bajo la curva de Hb3				
Área	Desv. Error	Significación asintótica	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
0,692	0,065	0,007	0,564	0,819

**Tabla 108. Sensibilidad, especificidad e índice de Youden  
(en color morado) para la hemoglobina 3 (Hb3)**

<b>Hb3</b>	<b>TVP</b>	<b>TFP</b>	<b>TVN</b>	<b>Youden Index</b>
	Sensibilidad	1 - Especificidad	Especificidad	
6,900	1,000	1,000	0,000	0,000
8,100	1,000	0,963	0,037	0,037
8,450	1,000	0,926	0,074	0,074
8,850	0,976	0,926	0,074	0,050
9,250	0,976	0,889	0,111	0,087
9,450	0,976	0,852	0,148	0,124
9,550	0,952	0,852	0,148	0,101
9,650	0,952	0,815	0,185	0,138
9,800	0,952	0,778	0,222	0,175
9,950	0,929	0,741	0,259	0,188
10,050	0,929	0,667	0,333	0,262
10,200	0,881	0,667	0,333	0,214
10,350	0,833	0,667	0,333	0,167
10,450	0,810	0,667	0,333	0,143
10,550	0,786	0,667	0,333	0,119
10,650	0,738	0,593	0,407	0,146
10,750	0,738	0,556	0,444	0,183
10,900	0,738	0,519	0,481	0,220
11,050	0,714	0,481	0,519	0,233
11,150	0,714	0,407	0,593	0,307
11,250	0,690	0,407	0,593	0,283
11,350	0,667	0,407	0,593	0,259
<b>11,450</b>	<b>0,643</b>	<b>0,259</b>	<b>0,741</b>	<b>0,384</b>
11,550	0,595	0,259	0,741	0,336
11,650	0,571	0,259	0,741	0,312
11,750	0,548	0,259	0,741	0,288
11,850	0,476	0,222	0,778	0,254
11,950	0,452	0,222	0,778	0,230
12,050	0,429	0,185	0,815	0,243
12,150	0,405	0,185	0,815	0,220
12,250	0,381	0,148	0,852	0,233
12,350	0,357	0,148	0,852	0,209
12,500	0,357	0,111	0,889	0,246
12,650	0,333	0,111	0,889	0,222
12,800	0,310	0,111	0,889	0,198
12,950	0,262	0,074	0,926	0,188
13,050	0,238	0,074	0,926	0,164
13,200	0,214	0,074	0,926	0,140
13,350	0,214	0,037	0,963	0,177
13,500	0,167	0,037	0,963	0,130
13,850	0,143	0,037	0,963	0,106
14,250	0,119	0,037	0,963	0,082
14,500	0,095	0,037	0,963	0,058
14,700	0,048	0,037	0,963	0,011
14,950	0,048	0,000	1,000	0,048
16,100	0,000	0,000	1,000	0,000

#### 4.2.4.1.2.3. Cálculo del índice de Youden para la ratio LMR2

La curva ROC para LMR2 (Figura 99) demostró por sí sola una insuficiente capacidad discriminatoria (AUC = 0,67; IC 95% 0,55 – 0,80; p = 0,011) (Tabla 109). Atendiendo a la tabla de coordenadas, determinamos el punto de corte ideal en 1,26 (Tabla 110).

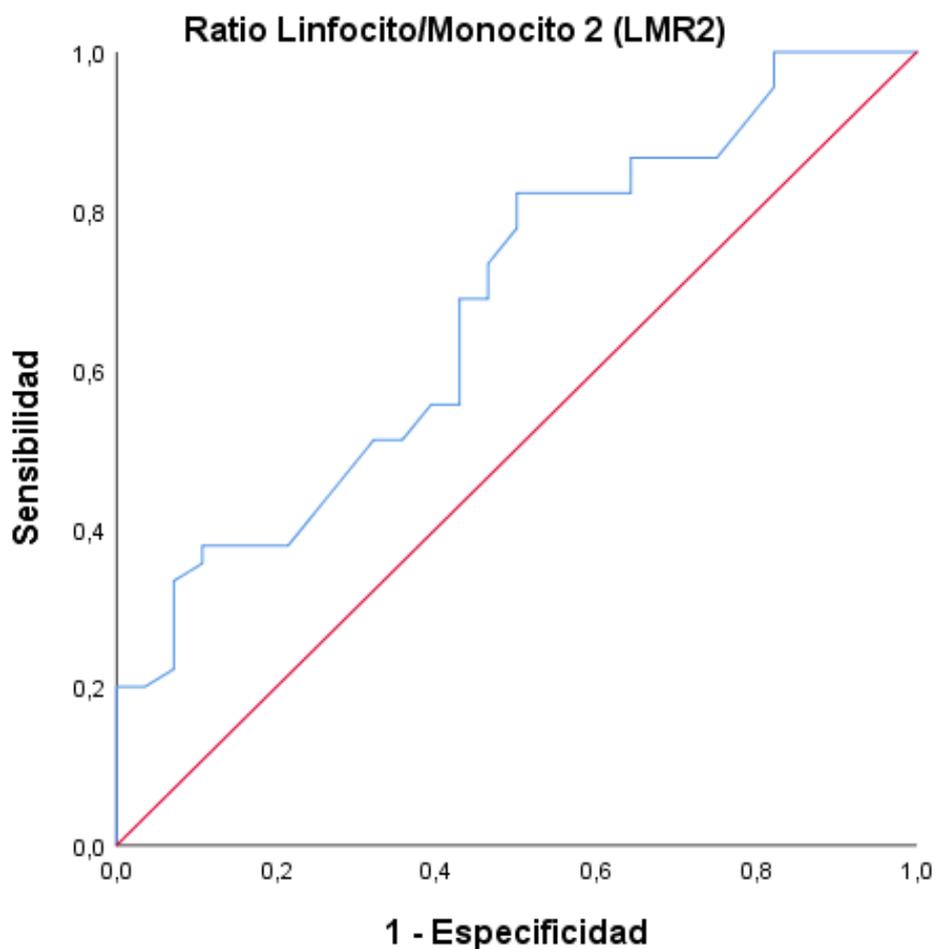


Figura 99. Curva ROC de la variable ratio linfocito/monocito 2 (LMR2).

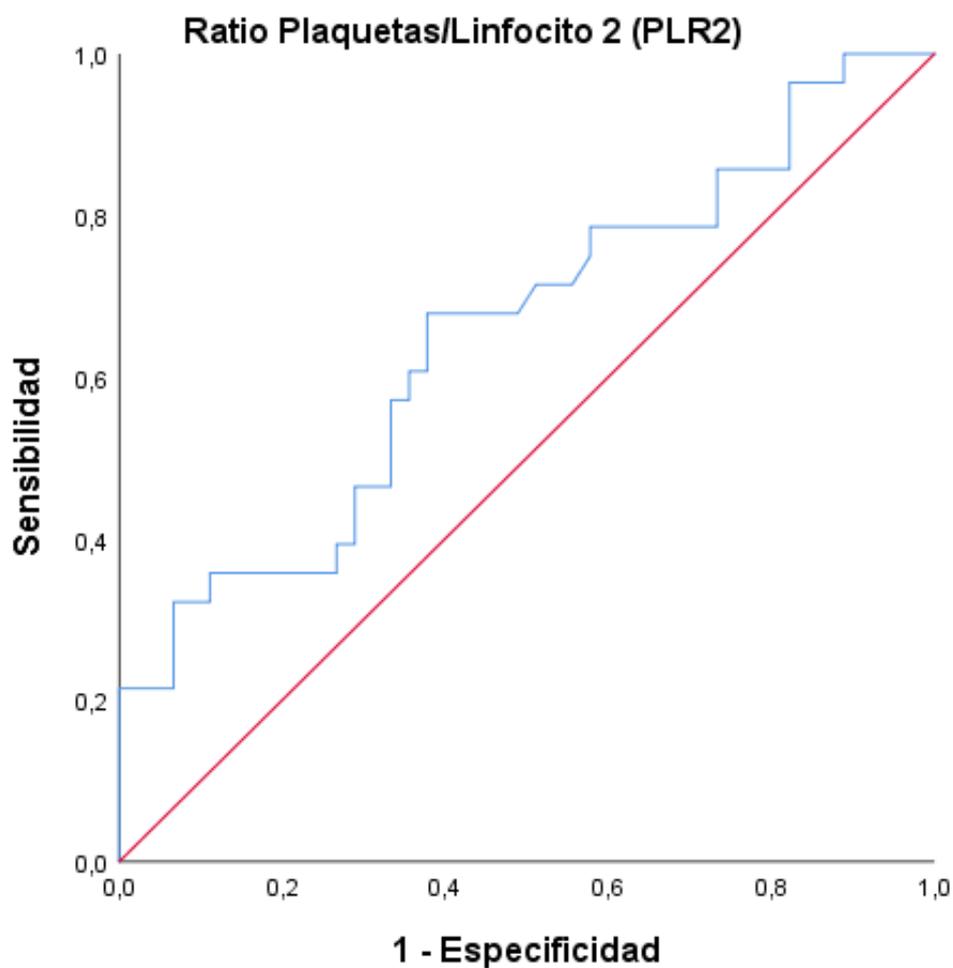
Tabla 109. Área bajo la curva de LMR2				
Área	Desv. Error	Significación asintótica	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
0,678	0,064	0,011	0,553	0,803

**Tabla 110. Sensibilidad, especificidad e índice de Youden  
(en color azul) para el ratio linfocito/monocito 2 (LMR2)**

LMR2	TVP	TFP	TVN	Youden Index
	Sensibilidad	1 - Especificidad	Especificidad	
-0,4286	1,000	1,000	0,000	0,000
0,5857	1,000	0,929	0,071	0,071
0,6333	1,000	0,893	0,107	0,107
0,7083	1,000	0,857	0,143	0,143
0,7639	1,000	0,821	0,179	0,179
0,7889	0,978	0,821	0,179	0,156
0,9000	0,956	0,821	0,179	0,134
1,0714	0,867	0,750	0,250	0,117
1,1548	0,867	0,714	0,286	0,152
1,1833	0,867	0,643	0,357	0,224
1,2250	0,822	0,643	0,357	0,179
<b>1,2679</b>	<b>0,822</b>	<b>0,500</b>	<b>0,500</b>	<b>0,322</b>
1,3095	0,800	0,500	0,500	0,300
1,3667	0,778	0,500	0,500	0,278
1,4143	0,733	0,464	0,536	0,269
1,4416	0,689	0,464	0,536	0,225
1,4773	0,689	0,429	0,571	0,260
1,5500	0,667	0,429	0,571	0,238
1,6125	0,622	0,429	0,571	0,194
1,6458	0,600	0,429	0,571	0,171
1,6905	0,578	0,429	0,571	0,149
1,7321	0,556	0,429	0,571	0,127
1,7750	0,556	0,393	0,607	0,163
1,8167	0,511	0,357	0,643	0,154
1,9167	0,511	0,321	0,679	0,190
2,1250	0,378	0,214	0,786	0,163
2,2679	0,378	0,107	0,893	0,271
2,3095	0,356	0,107	0,893	0,248
2,3667	0,333	0,071	0,929	0,262
2,4500	0,311	0,071	0,929	0,240
2,5500	0,289	0,071	0,929	0,217
2,6333	0,267	0,071	0,929	0,195
2,7333	0,244	0,071	0,929	0,173
2,8167	0,222	0,071	0,929	0,151
2,9038	0,200	0,036	0,964	0,164
2,9872	0,200	0,000	1,000	0,200
3,1000	0,178	0,000	1,000	0,178
3,2667	0,156	0,000	1,000	0,156
3,6667	0,111	0,000	1,000	0,111
4,1250	0,089	0,000	1,000	0,089
4,3750	0,067	0,000	1,000	0,067
4,7500	0,044	0,000	1,000	0,044
7,5000	0,022	0,000	1,000	0,022
11,0000	0,000	0,000	1,000	0,000

#### 4.2.4.1.2.4. Cálculo del índice de Youden para la ratio PLR2

De manera similar al resto, la curva ROC para PLR2 (Figura 100) mostró una insuficiente capacidad discriminatoria (AUC = 0,65; IC 95% 0,52 – 0,78; p = 0,029) (Tabla 111). De acuerdo a la tabla de coordenadas, el punto de corte fue 229,5 (Tabla 112)



*Figura 100. Curva ROC de la variable ratio plaquetas/linfocitos 2 (LMR2).*

<b>Tabla 111. Área bajo la curva de PLR2</b>				
<b>Área</b>	<b>Desv. Error</b>	<b>Significación asintótica</b>	<b>95% de intervalo de confianza</b>	
			<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>
0,652	0,067	0,029	0,521	0,784

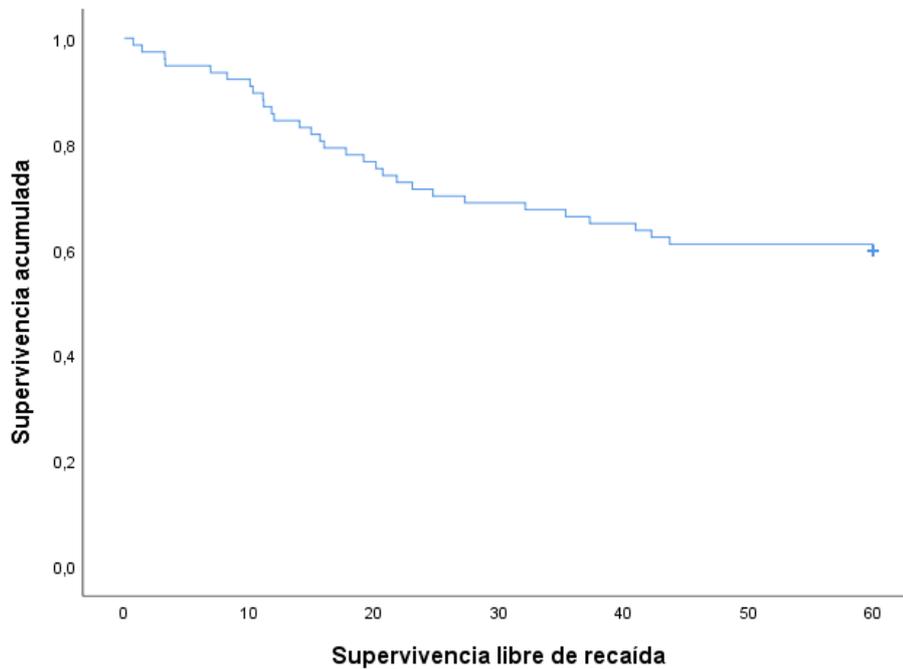
**Tabla 112. Sensibilidad, especificidad e índice de Youden  
(en color rojo) para el ratio plaquetas/linfocitos 2 (PLR2)**

PLR2	TVP	TFP	TVN	Youden Index
	Sensibilidad	1 - Especificidad	Especificidad	
56,0000	1,000	1,000	0,000	0,000
59,6667	1,000	0,978	0,022	0,022
83,3542	1,000	0,956	0,044	0,044
113,8542	1,000	0,933	0,067	0,067
128,4524	1,000	0,911	0,089	0,089
133,6607	1,000	0,889	0,111	0,111
134,6875	0,964	0,889	0,111	0,075
135,8125	0,964	0,867	0,133	0,098
137,1176	0,964	0,844	0,156	0,120
141,9748	0,964	0,822	0,178	0,142
148,9683	0,929	0,822	0,178	0,106
153,4641	0,893	0,822	0,178	0,071
154,8529	0,857	0,822	0,178	0,035
155,9615	0,857	0,778	0,222	0,079
157,6282	0,857	0,756	0,244	0,102
158,7121	0,857	0,733	0,267	0,124
161,5455	0,821	0,733	0,267	0,088
164,3529	0,786	0,733	0,267	0,052
168,3529	0,786	0,711	0,289	0,075
173,7778	0,786	0,689	0,311	0,097
177,1528	0,786	0,667	0,333	0,119
181,0417	0,786	0,644	0,356	0,141
186,6667	0,786	0,622	0,378	0,163
192,8448	0,786	0,578	0,422	0,208
196,1782	0,750	0,578	0,422	0,172
197,2222	0,714	0,556	0,444	0,159
200,8889	0,714	0,533	0,467	0,181
204,7778	0,714	0,511	0,489	0,203
208,1624	0,679	0,489	0,511	0,190
215,8846	0,679	0,467	0,533	0,212
222,5000	0,679	0,444	0,556	0,234
224,8571	0,679	0,422	0,578	0,256
227,3571	0,679	0,400	0,600	0,279
<b>229,5000</b>	<b>0,679</b>	<b>0,378</b>	<b>0,622</b>	<b>0,301</b>
236,0714	0,643	0,378	0,622	0,265
244,8214	0,607	0,378	0,622	0,229
250,7500	0,607	0,356	0,644	0,252
256,5000	0,571	0,356	0,644	0,216
260,2143	0,571	0,333	0,667	0,238
262,8571	0,536	0,333	0,667	0,202
266,7857	0,500	0,333	0,667	0,167
271,1429	0,464	0,333	0,667	0,131
278,7222	0,464	0,311	0,689	0,153
288,4722	0,464	0,289	0,711	0,175
294,8214	0,429	0,289	0,711	0,140
298,5714	0,393	0,289	0,711	0,104

301,4286	0,393	0,267	0,733	0,126
303,5714	0,357	0,267	0,733	0,090
305,2679	0,357	0,244	0,756	0,113
309,7917	0,357	0,222	0,778	0,135
314,6667	0,357	0,200	0,800	0,157
316,7500	0,357	0,178	0,822	0,179
318,7500	0,357	0,156	0,844	0,202
321,2500	0,357	0,133	0,867	0,224
335,1389	0,357	0,111	0,889	0,246
358,0556	0,321	0,111	0,889	0,210
369,1667	0,321	0,089	0,911	0,233
376,0000	0,321	0,067	0,933	0,255
390,1667	0,286	0,067	0,933	0,219
425,6667	0,250	0,067	0,933	0,183
469,0000	0,214	0,067	0,933	0,148
532,5000	0,214	0,044	0,956	0,170
585,0000	0,214	0,022	0,978	0,192
610,0000	0,214	0,000	1,000	0,214
638,0000	0,179	0,000	1,000	0,179
768,0000	0,143	0,000	1,000	0,143
931,8750	0,107	0,000	1,000	0,107
1003,5417	0,071	0,000	1,000	0,071
1086,6667	0,036	0,000	1,000	0,036
1141,0000	0,000	0,000	1,000	0,000
56,0000	1,000	1,000	0,000	0,000
59,6667	1,000	0,978	0,022	0,022
83,3542	1,000	0,956	0,044	0,044
113,8542	1,000	0,933	0,067	0,067
128,4524	1,000	0,911	0,089	0,089
133,6607	1,000	0,889	0,111	0,111
134,6875	0,964	0,889	0,111	0,075
135,8125	0,964	0,867	0,133	0,098
137,1176	0,964	0,844	0,156	0,120
141,9748	0,964	0,822	0,178	0,142
148,9683	0,929	0,822	0,178	0,106
153,4641	0,893	0,822	0,178	0,071
154,8529	0,857	0,822	0,178	0,035
155,9615	0,857	0,778	0,222	0,079
157,6282	0,857	0,756	0,244	0,102

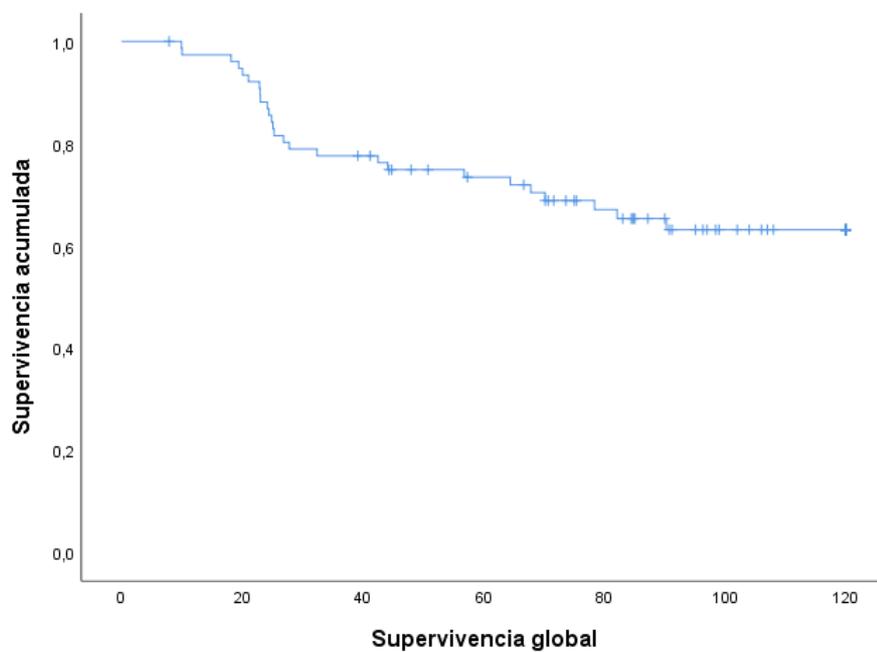
#### 4.2.4.1.3. Análisis multivariable de supervivencia

La media de supervivencia libre de recurrencia (la mediana no se alcanzó) a 5 años fueron 43,8 meses (95%CI: 38,9 – 48,7) (Figura 101).



**Figura 101. Supervivencia libre de recurrencia a 5 años en la totalidad de la muestra.**

La media de supervivencia global (la mediana no se alcanzó) a 10 años fue de 90,6 meses (+/- 4,8) (95%CI: 81,2 – 100,1) (Figura 102).



**Figura 102. Supervivencia global a 10 años en la totalidad de la muestra.**

#### 4.2.4.1.4. Factores pronósticos de supervivencia

##### 4.2.4.1.4.1. Mutaciones en KRAS

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes KRAS mutados fue menor que en los KRAS Wild Type [36,8% vs 68,4%;  $p$  (log Rank test) = 0,001] (Figura 103).

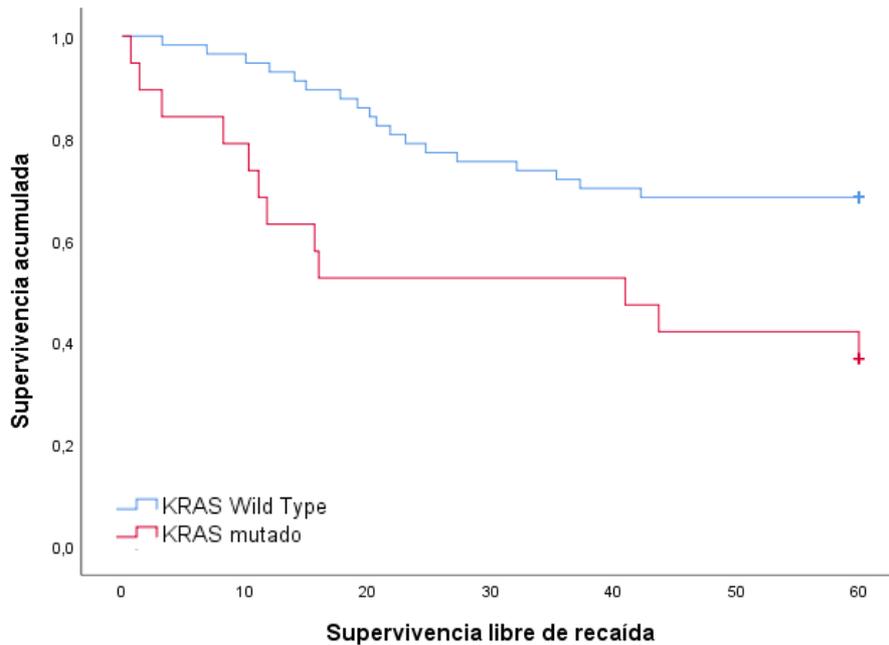


Figura 103. Supervivencia libre de recurrencia a 5 años en función del estatus de KRAS

La SG a 5 años de los pacientes KRAS mutados también fue menor que la de los pacientes KRAS Wild Type [47,4% vs 73,7%;  $p$  (log Rank test) = 0,022] (Figura 104).

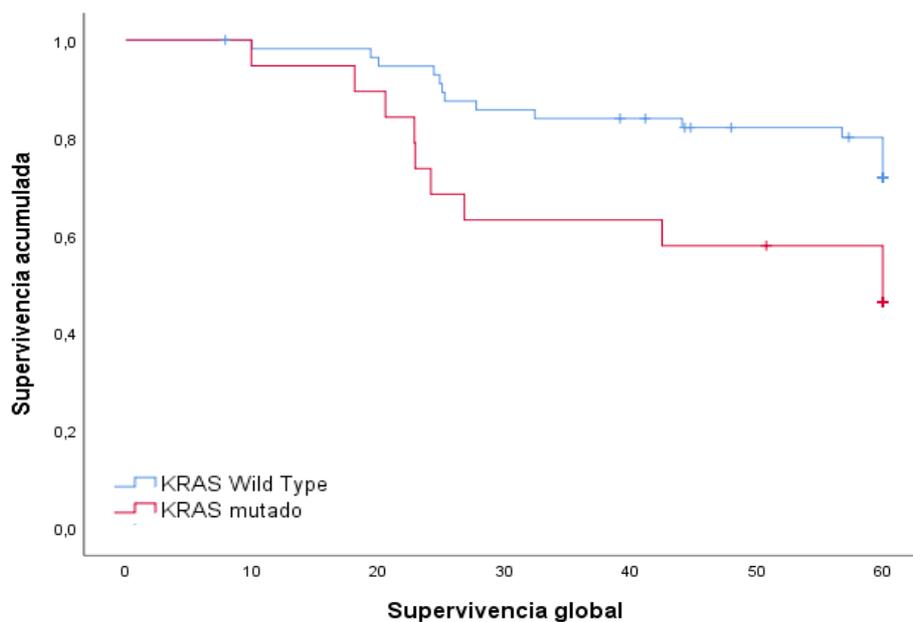
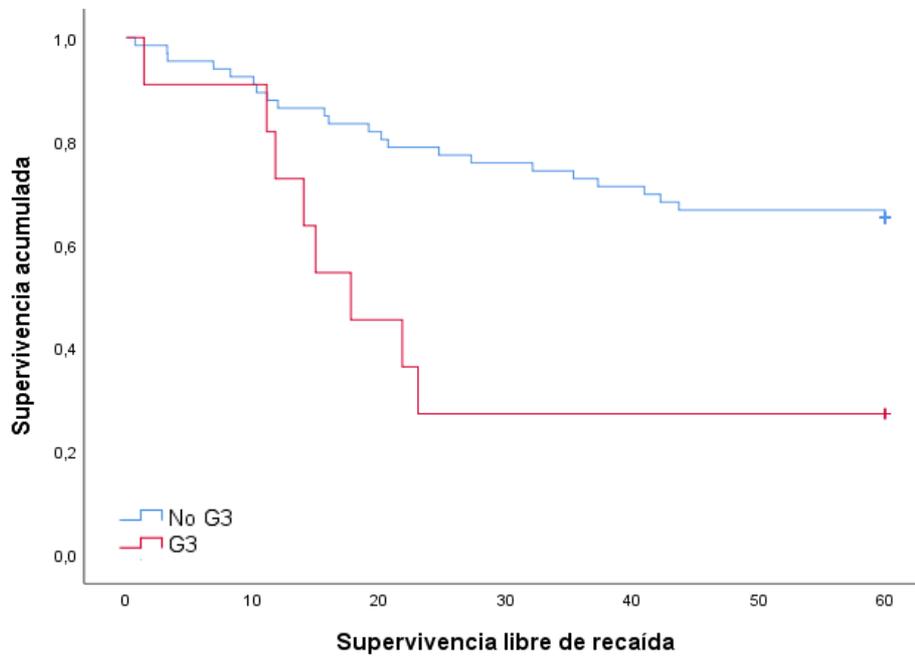


Figura 104. Supervivencia global a 5 años en función del estatus de KRAS

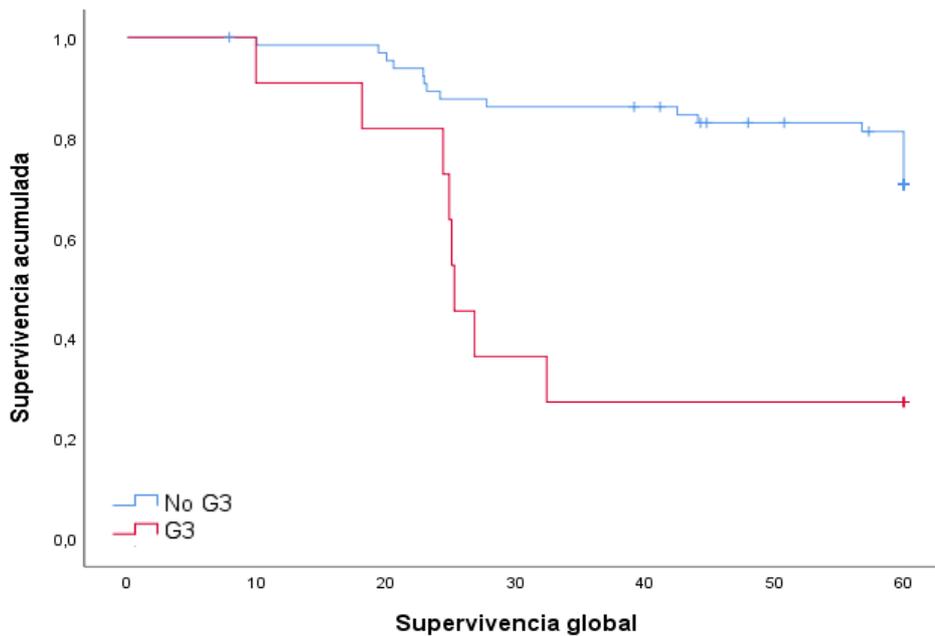
#### 4.2.4.1.4.2. Grado histológico pobremente diferenciado (G3)

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes con G3 fue menor frente a los pacientes sin G3 [27,3,4% vs 65,2%; p (log Rank test) = 0,003] (Figura 105).



**Figura 105. Supervivencia libre de recaída a 5 años en función del grado G3.**

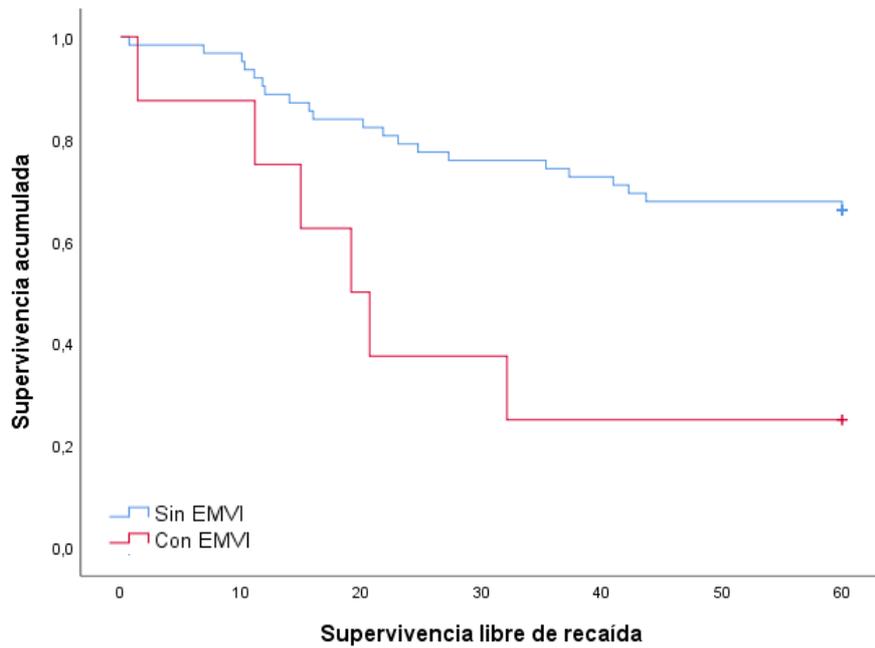
La supervivencia global a 5 años de los pacientes con G3 fue menor que la de los pacientes que no lo tuvieron [27,3% vs 72,7%; p (log Rank test) <0,001] (Figura 106).



**Figura 106. Supervivencia global a 5 años en función del grado G3.**

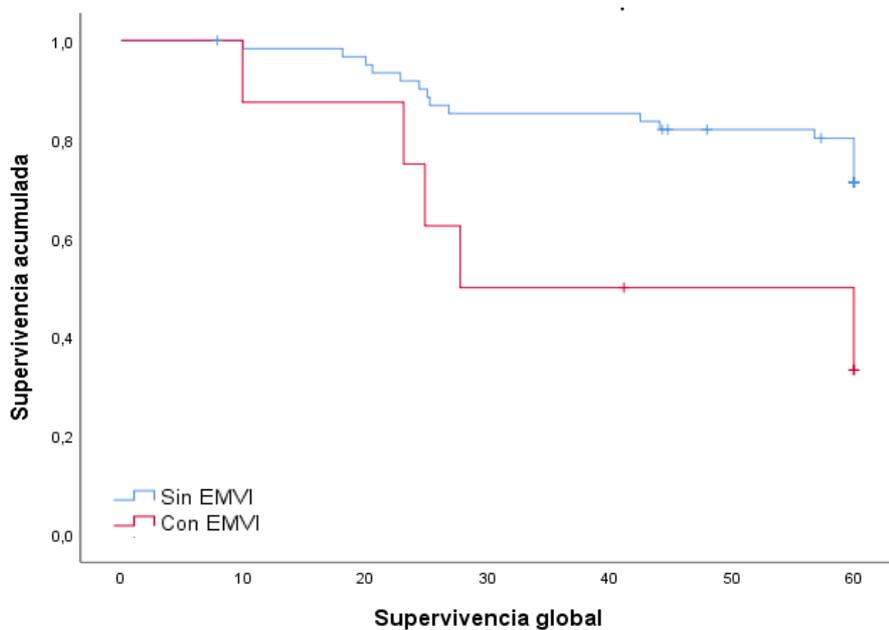
#### 4.2.4.1.4.3. Invasión vascular intramural (EMVI)

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes con EMVI fue menor frente a los pacientes sin EMVI [25% vs 66,1%;  $p$  (log Rank test) = 0,005] (Figura 107).



**Figura 107. Supervivencia libre de recaída a 5 años en función de la presencia de EMVI.**

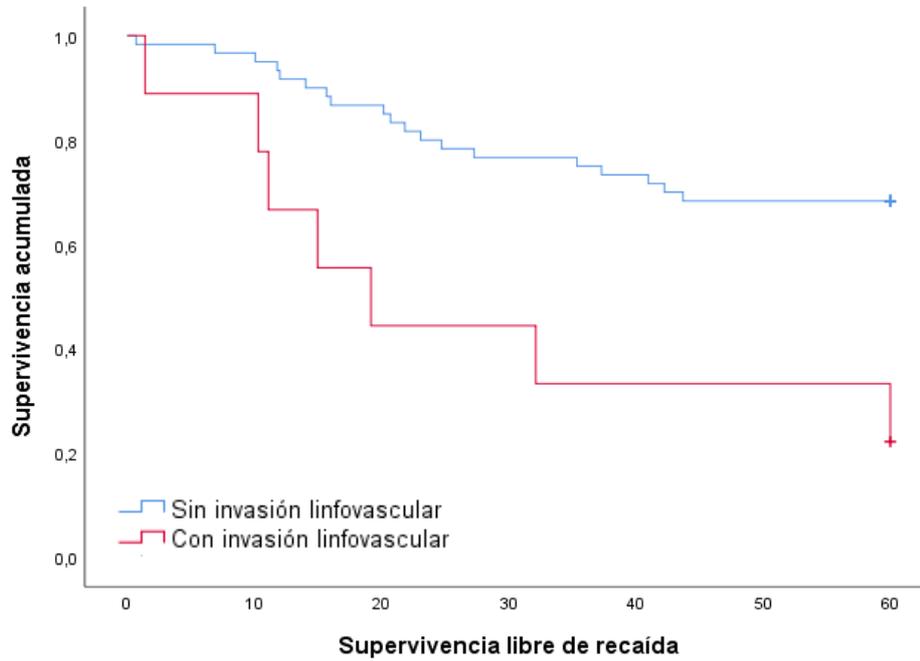
La SG a 5 años de los pacientes con EMVI fue significativamente menor que la de aquellos sin ella [37,5% vs 72,6%;  $p$  (log Rank test) = 0,014] (Figura 108).



**Figura 108. Supervivencia global a 5 años en función de la presencia de EMVI.**

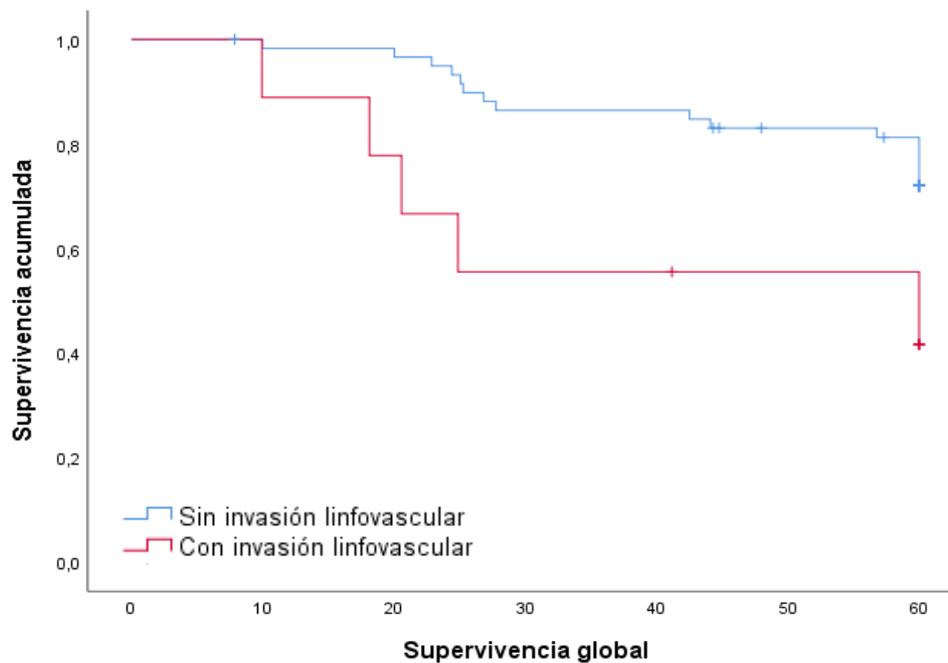
#### 4.2.4.1.4.4. Invasión linfovascular (LVI)

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes con LVI fue menor que en los pacientes sin ella [22,2% vs 68,3%;  $p$  (log Rank test) = 0,001] (Figura 109).



**Figura 109.** Supervivencia libre de recaída a 5 años en función de la presencia de LVI.

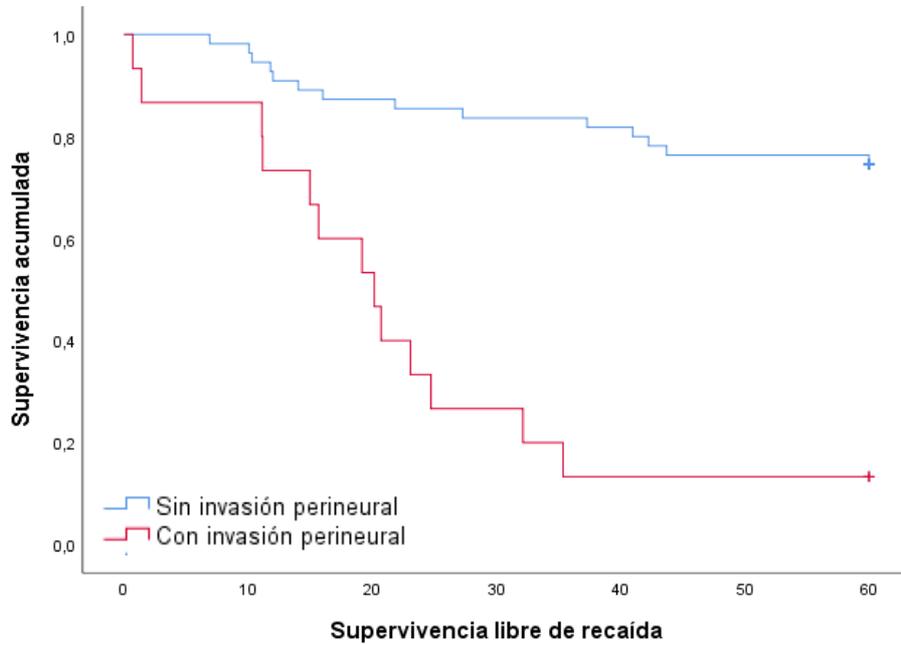
La supervivencia global a 5 años de los pacientes con LVI fue menor que la de aquellos sin ella [44% vs 73,3%;  $p$  (log Rank test) = 0,020] (Figura 110).



**Figura 110.** Supervivencia global a 5 años en función de la presencia de LVI.

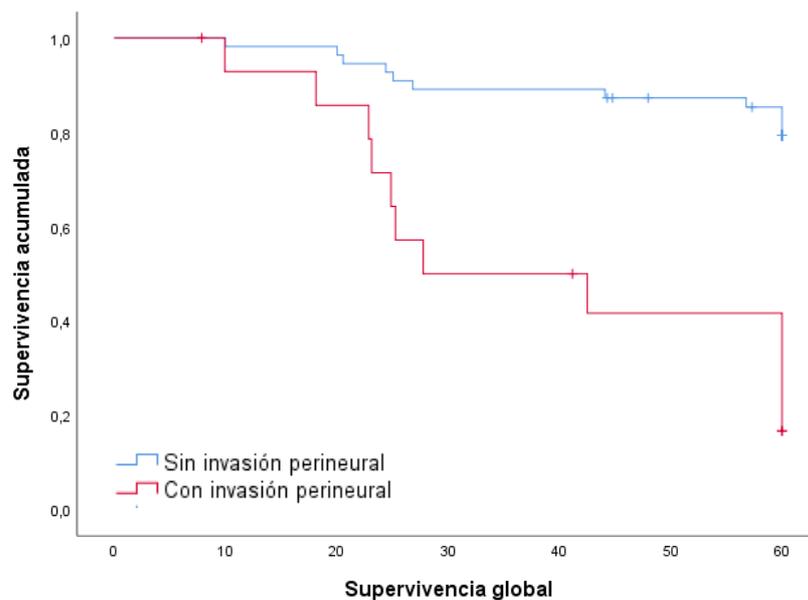
#### 4.2.4.1.4.5. Invasión perineural (PNI)

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes con PNI fue menor que en aquellos sin ella [13,3% vs 74,5%;  $p$  (log Rank test)  $<0,001$ ] (Figura 111).



**Figura 111. Supervivencia libre de recaída a 5 años en función de la presencia de PNI.**

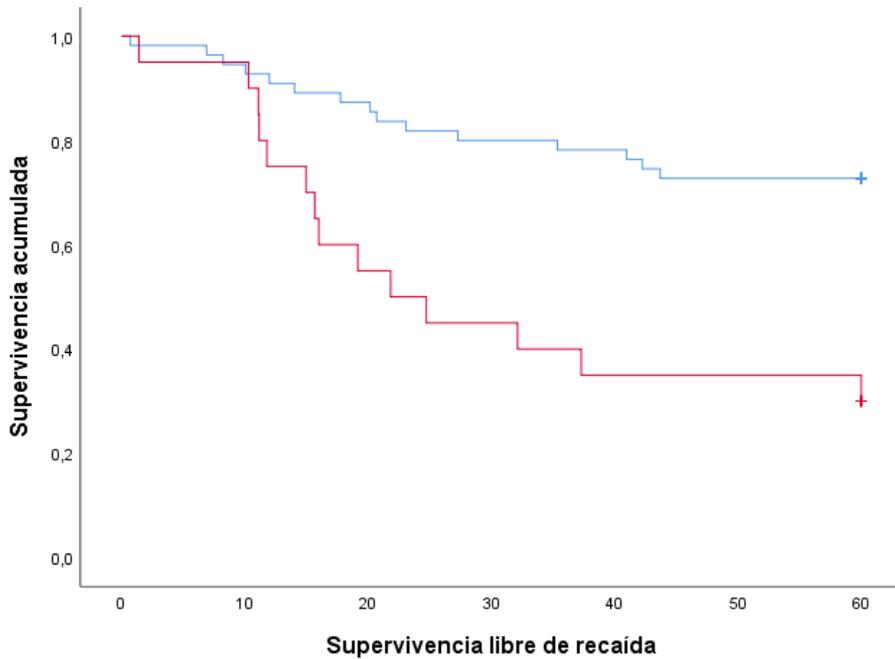
La supervivencia global a 5 años de los pacientes con permeación perineural fue menor que la de aquellos sin ella [26,7% vs 80%;  $p$  (log Rank test)  $<0,001$ ] (Figura 112).



**Figura 112. Supervivencia global a 5 años en función de la presencia de PNI**

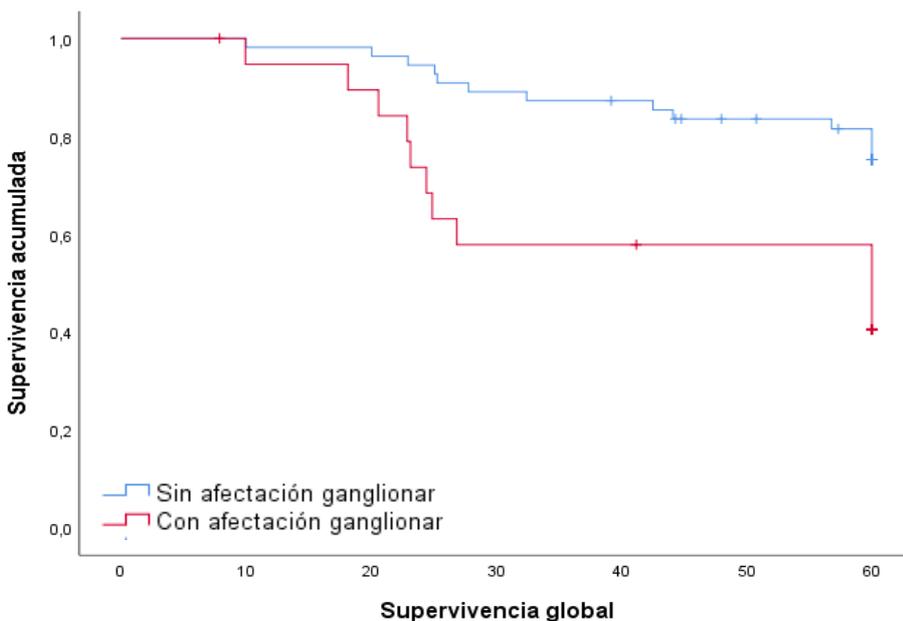
#### 4.2.4.1.4.6. Afectación ganglionar (ypN+)

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes con afectación ganglionar tras la cirugía fue menor que en aquellos sin ella [30% vs 72,7%; p (log Rank test) <0,001] (Figura 113).



**Figura 113. Supervivencia libre de recaída a 5 años según la afectación ganglionar.**

La SG a 5 años de los pacientes con afectación ganglionar tras la cirugía fue menor que la de aquellos sin ella [45% vs 76,4%; p (log Rank test) = 0,002] (Figura 114).



**Figura 114. Supervivencia global a 5 años en función de la afectación ganglionar.**

#### 4.2.4.1.4.7. Niveles de Hb2 <12,3g/dL

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes con niveles de Hb2 menores de 12,3 g/dL fue menor que aquellos que presentaron niveles más elevados [35% vs 71,7%; p (Log Rank test) = 0,001] (Figura 115).

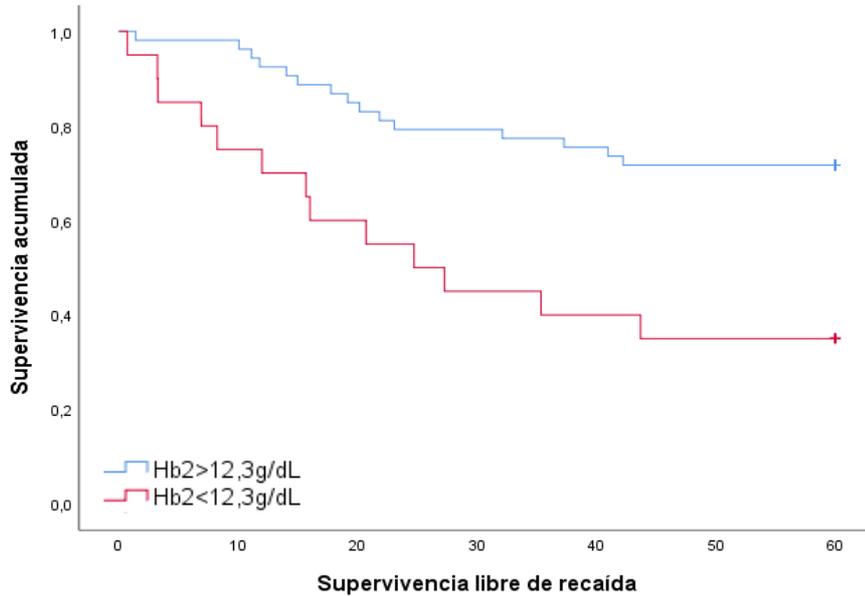


Figura 115. Supervivencia libre de recaída a 5 años según nivel de Hb2 = 12,3g/dL.

La SG a 5 años de los pacientes con niveles de Hb2 menores de 12,3 g/dL fue menor que en aquellos con niveles más altos [50% vs 73,6%; p (Log Rank test) = 0,024] (Figura 116).

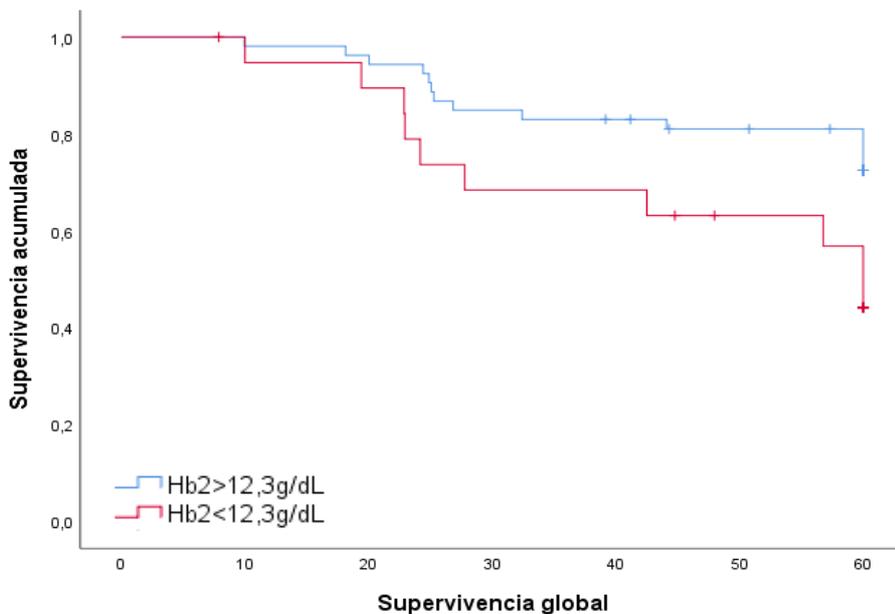


Figura 116. Supervivencia global a 5 años según nivel de Hb2 = 12,3g/dL.

#### 4.2.4.1.4.8. Niveles de Hb3 <11.45g/dL

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes con niveles de Hb3 menores de 11,45 g/dL fue menor que aquellos que presentaron niveles más elevados [44,4% vs 78,8%; p (Log Rank test) = 0,005] (Figura 117).

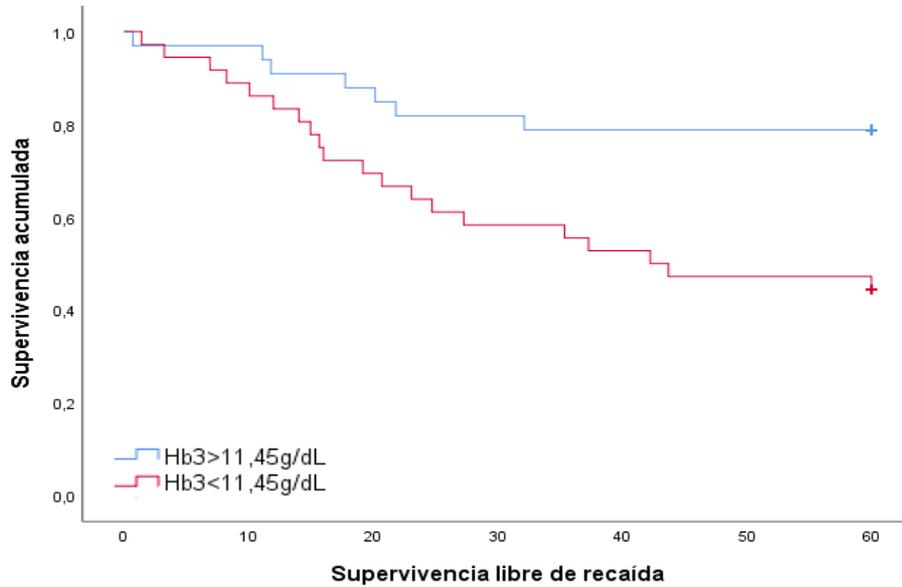


Figura 117. Supervivencia libre de recaída a 5 años según nivel de Hb3 = 11,45g/dL.

La SG a 5 años de los pacientes con niveles de Hb3 menores de 11,45g/dL fue menor que aquellos con niveles más elevados (58,3% vs 78,8%; p (Log Rank test) = 0,041) (Figura 118).

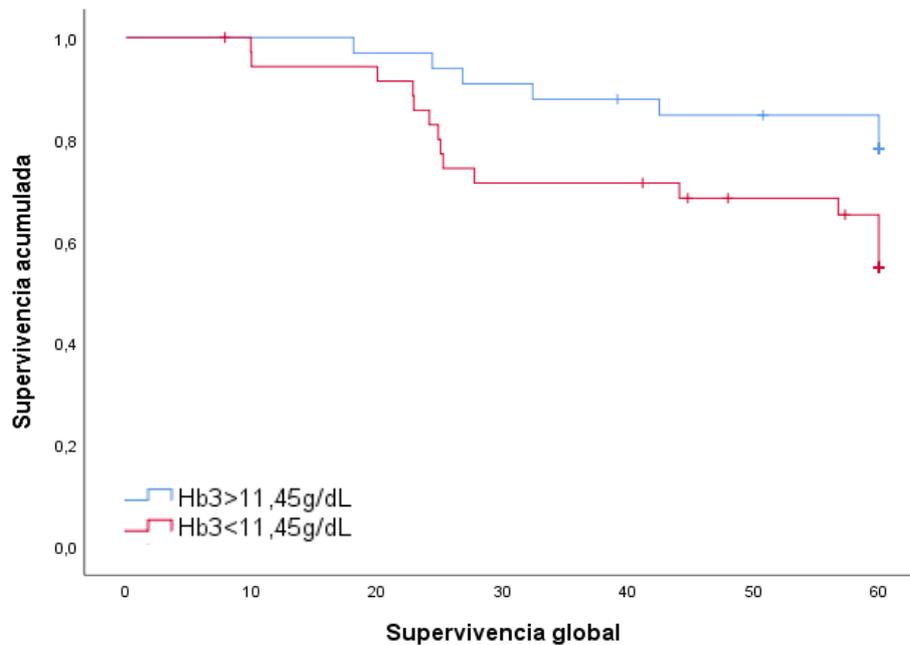


Figura 118. Supervivencia global a 5 años según nivel de Hb3 = 11,45g/dL.

#### 4.2.4.1.4.9. Niveles de LMR2 <1,26

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes con niveles de LMR2 menores de 1,26 fue significativamente menor que la de aquellos con niveles superiores [36,4% vs 72,5%; p (Log Rank test) = 0,005] (Figura 119).

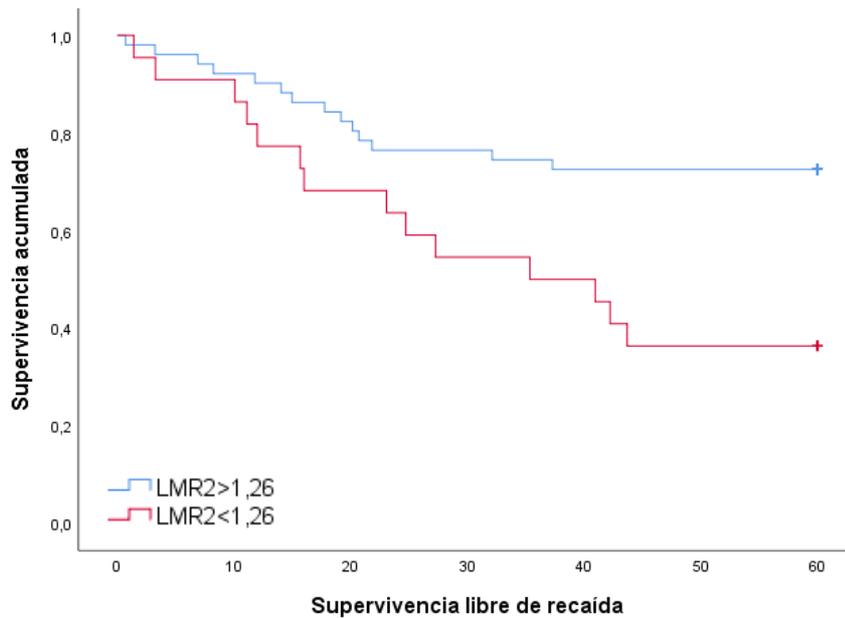


Figura 119. Supervivencia libre de recaída a 5 años según nivel de LMR2 = 1,26.

La SG a 5 años de los pacientes con niveles de LMR2 menores de 1,26 fue menor que aquellos con niveles mayores [50% vs 74,5%; p (Log Rank test) = 0,021] (Figura 120).

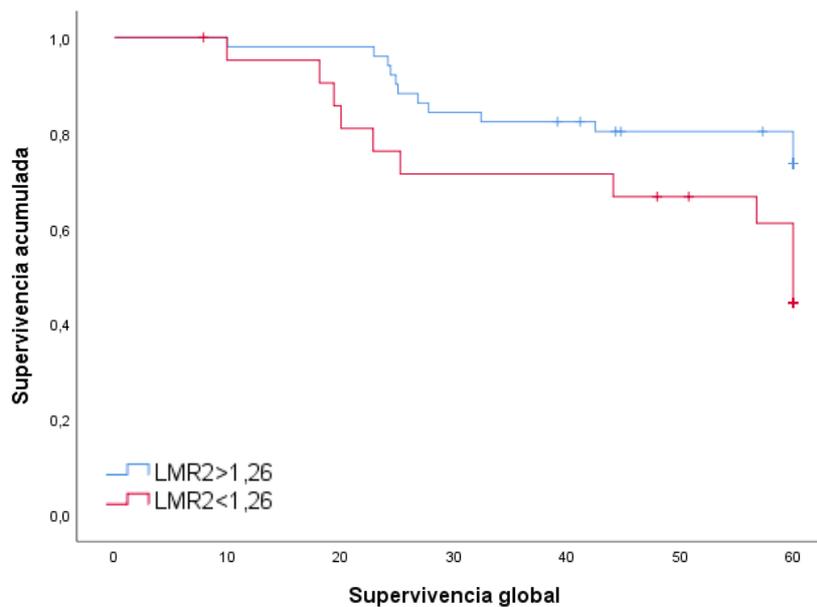


Figura 120. Supervivencia global a 5 años según nivel de LMR2 = 1,26.

#### 4.2.4.1.4.10. Niveles de PLR2 >229,5

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes con niveles de PLR2 mayores de 229,5 fue menor que la de aquellos con niveles menores, alcanzando la significación estadística [47,2% vs 75,7%; p (Log Rank test) = 0,012] (Figura 121).

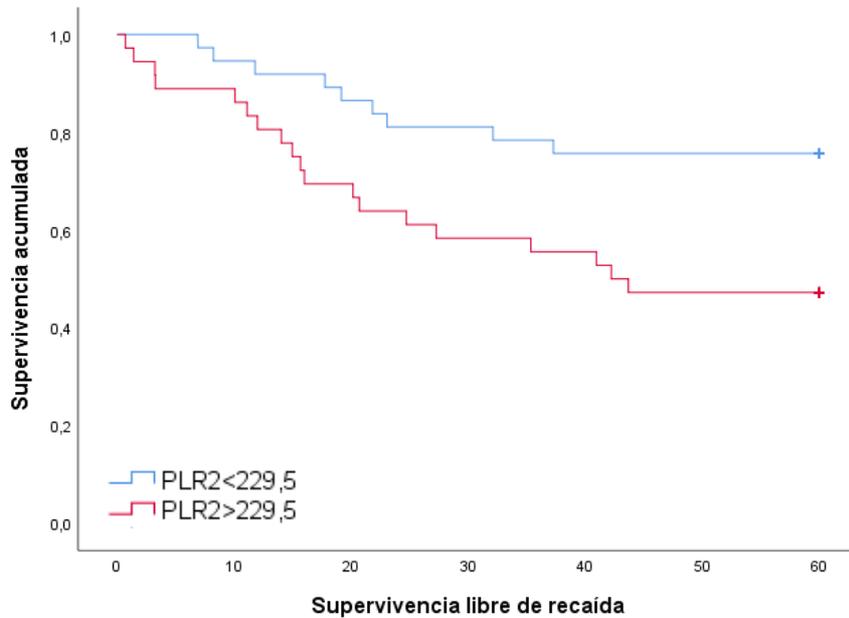


Figura 121. Supervivencia libre de recaída a 5 años según el nivel de PLR2 = 229,5.

La SG a 5 años de los pacientes con niveles de PLR2 mayores de 229,5 fue menor que aquellos con niveles mayores [55,6% vs 78,4%; p (Log Rank test) = 0,033] (Figura 122).

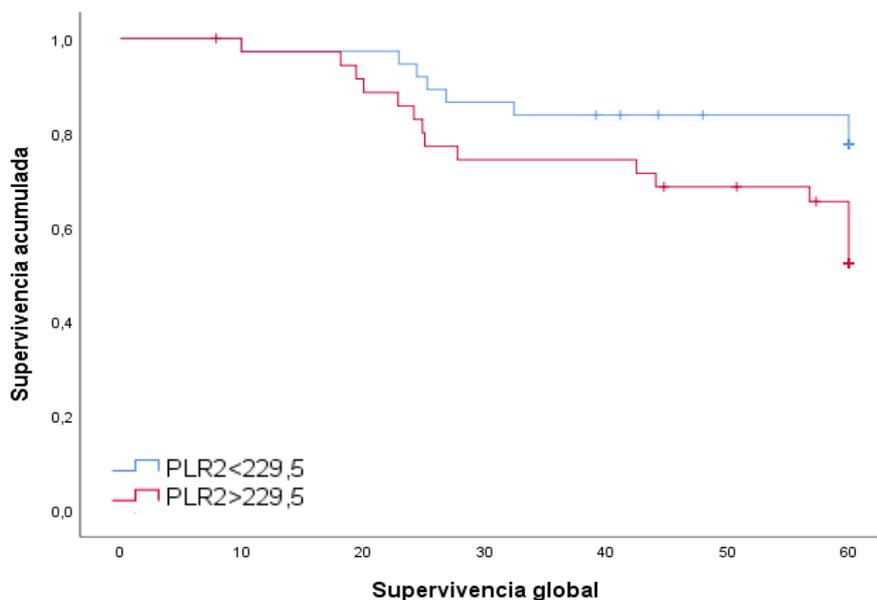
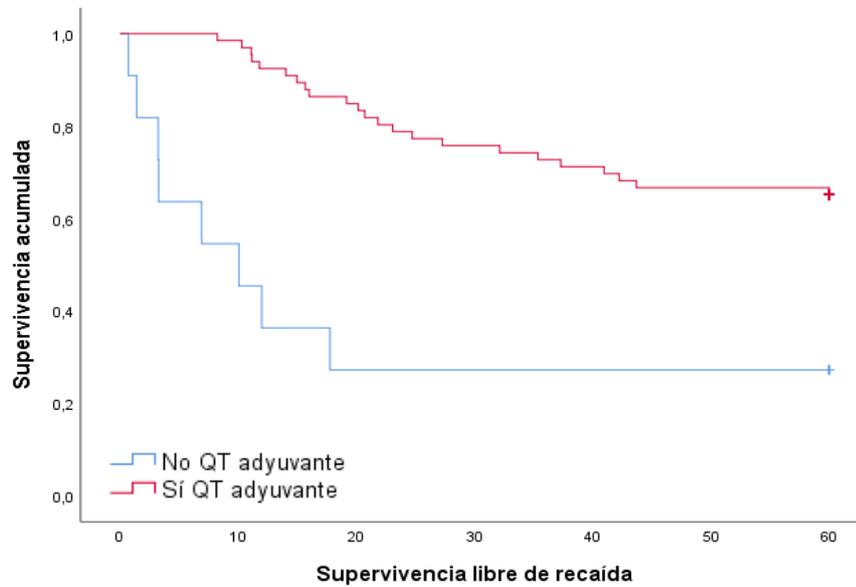


Figura 122. Supervivencia global a 10 años según nivel de PLR2 = 229,5.

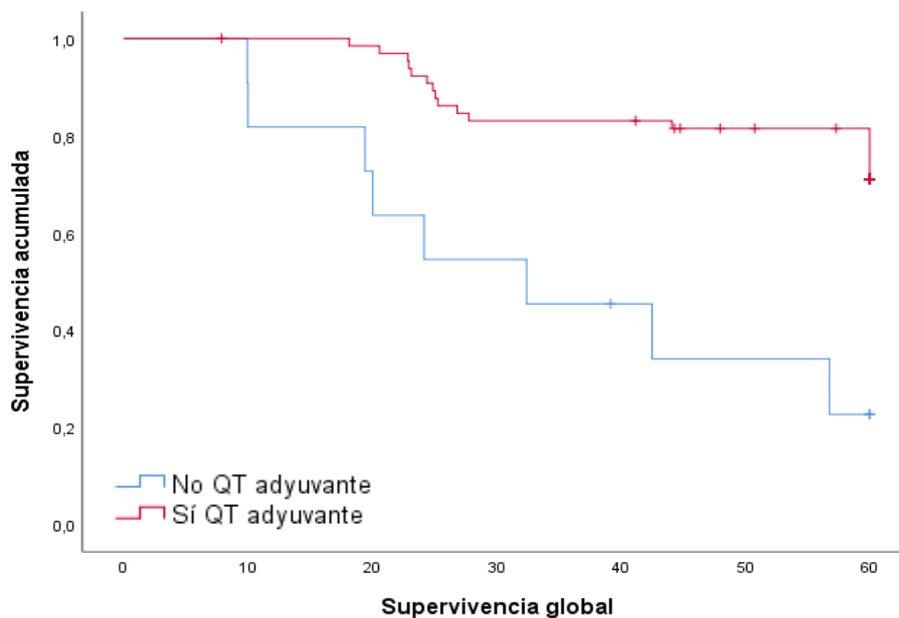
#### 4.2.4.1.4.11. Quimioterapia adyuvante

La supervivencia libre de recaída a 5 años de los pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante fue significativamente mayor a la de aquellos que no la recibieron [65,2% vs 27,3%; p (Log Rank test) <0,001] (Figura 123).



**Figura 123. Supervivencia libre de recaída a 5 años según se reciba o no QT adyuvante.**

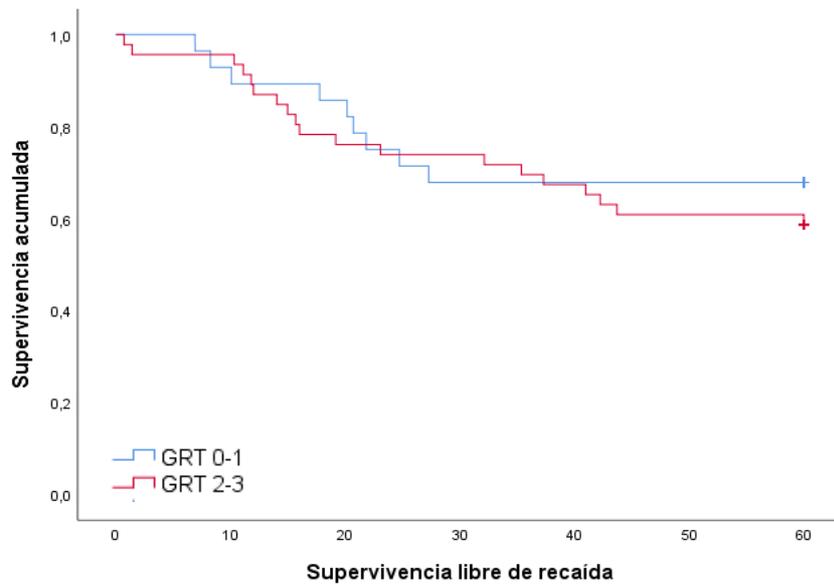
La SG a 5 años de los pacientes que recibieron QT adyuvante fue significativamente superior a la de aquellos que no la recibieron [72,7% vs 27,3%; p (Log Rank test) <0,012] (Figura 124).



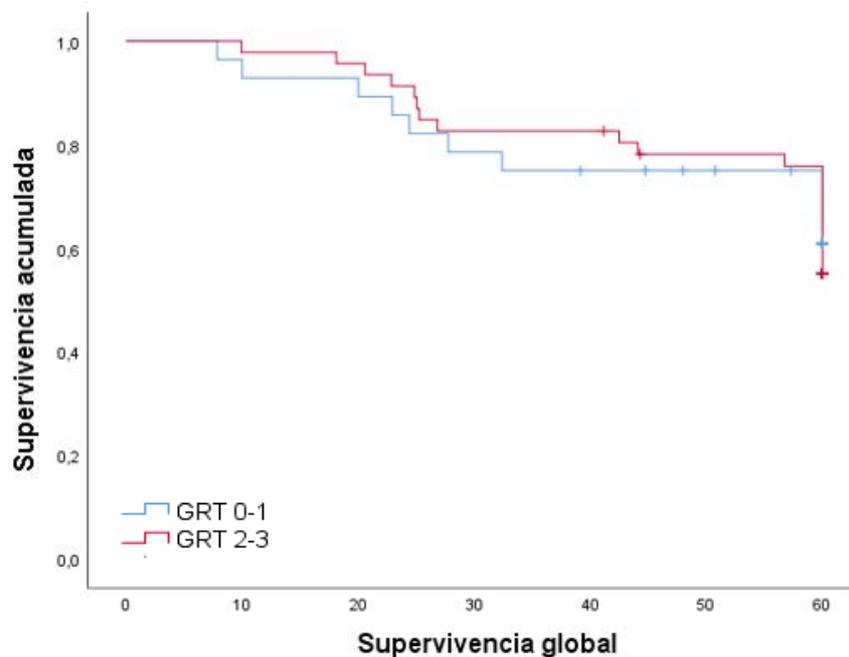
**Figura 124. Supervivencia global a 5 años en según se reciba o no la QT adyuvante**

#### 4.2.4.1.4.12. Grado de regresión tumoral e impacto en la supervivencia

Dada la controversia existente acerca de la relevancia pronóstica del GRT y su papel como marcador subrogado de supervivencia, quisimos analizar en nuestra cohorte de pacientes el impacto entre el GRT y la supervivencia. Para ello, estratificamos a los pacientes en dos grupos según el tipo de respuesta evaluada por GRT (Buena respuesta = TRG0 y TRG1; Pobre respuesta = TRG2 y TRG3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en supervivencia libre de recaída [p (Log Rank) = 0,496] (Figura) ni en SG a los 5 años [p (Log Rank) = 0,847] (Figuras 125 y 126).

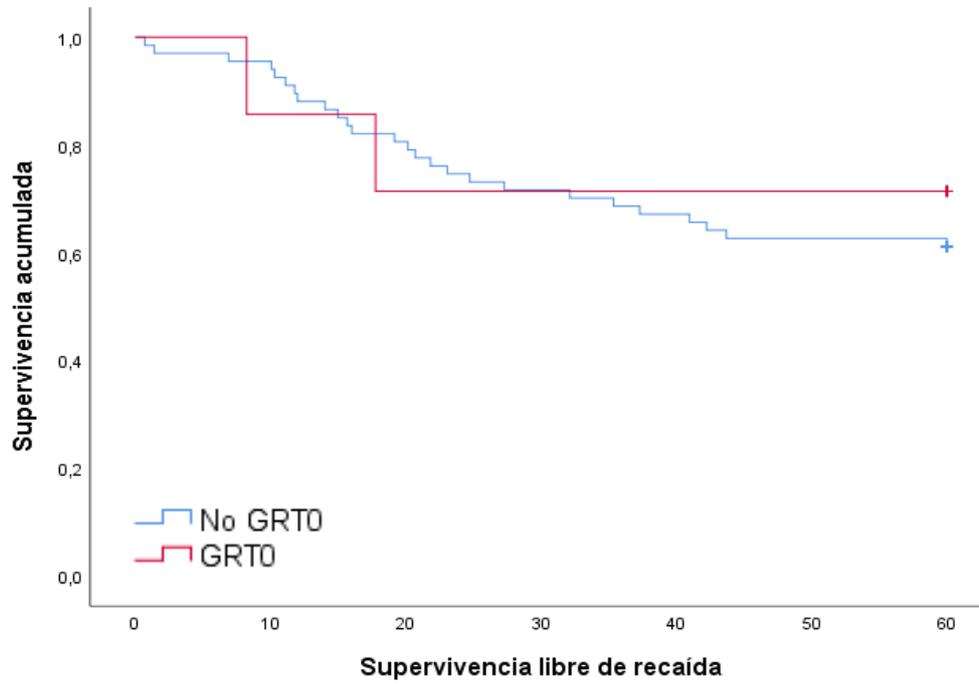


**Figura 125. Impacto del GRT en la supervivencia libre de recaída a 5 años.**

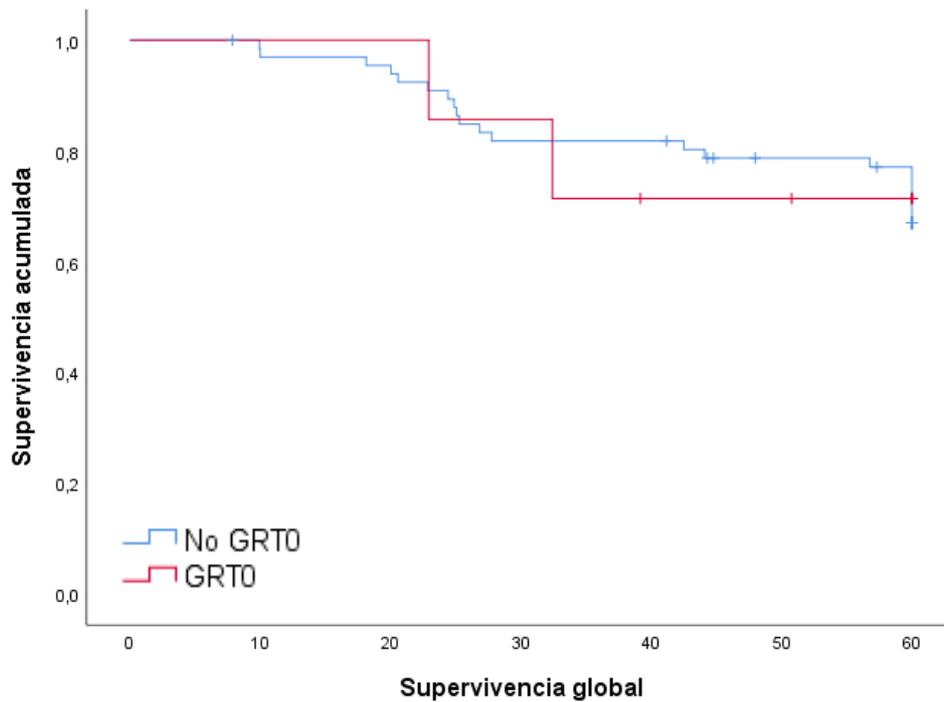


**Figura 126. Impacto del GRT en la supervivencia global a 5 años.**

Los pacientes que alcanzaron respuesta completa patológica (GRT 0) tampoco alcanzaron diferencias significativas ni en supervivencia libre de recaída a 5 años [p (Log Rank) = 0,687] ni en SG [p (Log Rank) = 0,961]] (Figuras 127 y 128).



**Figura 127. Impacto del GRT0 en la supervivencia libre de recaída a 5 años.**



**Figura 128. Impacto del GRT0 en la supervivencia global a 5 años.**

#### 4.2.4.1.5. Regresión logística y modelo pronóstico de supervivencia

Con los resultados del análisis univariante, decidimos crear un modelo pronóstico (objeto de reciente publicación (533)) sobre la recaída utilizando las variables dicotómicas con diferencias significativas que nos parecieron más relevantes. En el primer paso introducimos 7 variables (mutaciones en RAS, EMVI, la invasión linfática y perineural, afectación ganglionar tras la cirugía, Hb2<12,3g/dL; LMR2<1,26 y PLR2 >229,5).

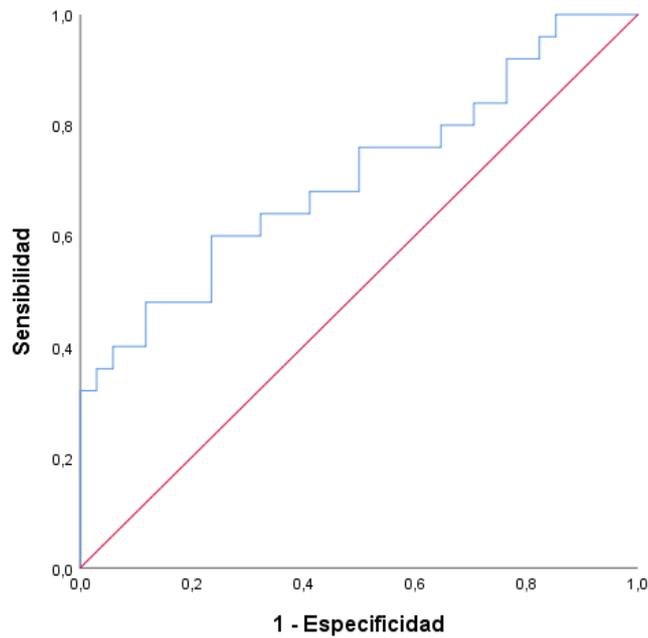
En la regresión logística de las siete variables introducidas en el modelo, encontramos que cinco de ellas continuaban siendo estadísticamente significativas; la invasión perineural, la afectación ganglionar, los niveles de hemoglobina 2 (Hb2) menores de 12,3 mg/dL, la ratio linfocito/monocito (LMR2) menores de 1,26 y la ratio plaquetas/neutrófilos (PLR2) mayores de 229 (Tabla 113).

<b>Tabla 113. Regresión logística con siete variables</b>						
<b>Variable</b>	<b>B</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Wald</b>	<b>Gl</b>	<b>p</b>	<b>Exp (B)</b>
Mutación RAS	0,803	1,047	0,588	1	0,443	2,232
EMVI	1,382	2,269	0,371	1	0,543	3,983
Invasión linfovascular	-0,946	2,578	0,135	1	0,714	0,388
Invasión perineural	3,282	1,261	6,775	1	<b>0,009</b>	26,619
Afectación ganglionar	3,461	1,287	7,230	1	<b>0,007</b>	31,851
Hb2<12,3 g/dL	2,006	1,017	3,892	1	<b>0,049</b>	7,432
LMR2<1,26	1,827	0,877	4,343	1	<b>0,037</b>	6,214
PLR2>229,5	1,867	1,006	3,448	1	<b>0,063</b>	6,469

Con estos datos, decidimos realizar un segundo análisis de regresión logística únicamente con las tres variables analíticas (Hb2, LMR2 y PLR2), ya que al poder disponer de las tres simultáneamente con la determinación analítica tras la QRT nos parecía una idea muy atractiva y sobre todo funcional y sencilla de implementar en la práctica clínica (Tabla 114), por lo que diseñamos un modelo con las tres variables.

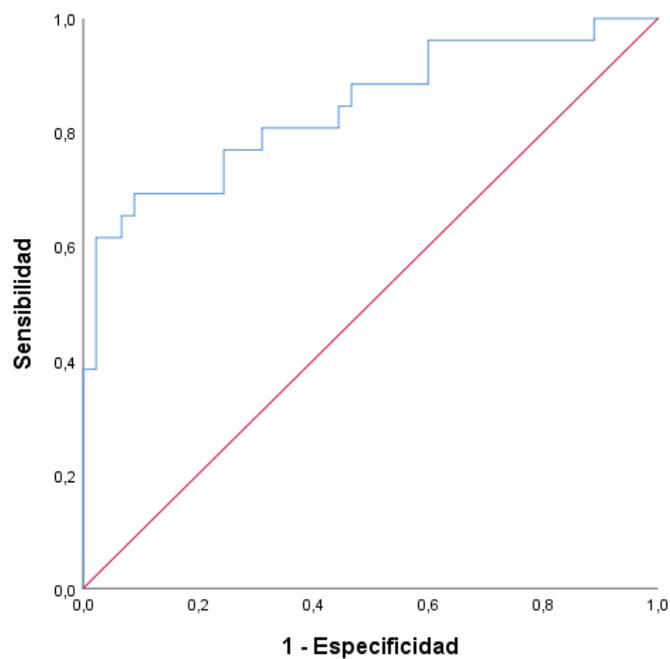
<b>Tabla 114. Regresión logística con tres variables</b>						
<b>Variable</b>	<b>B</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Wald</b>	<b>gl</b>	<b>p</b>	<b>Exp (B)</b>
Hb2<12,3 g/dL	1,355	,592	5,234	1	<b>0,022</b>	3,876
LMR2<1,26	1,084	,634	2,926	1	0,087	2,957
PLR2>229,5	,649	,602	1,163	1	0,281	1,913

La curva ROC (Figura 129) del modelo con tres variables demostró una capacidad pronóstica para determinar la recaída aceptable (AUC = 0,707; 95%CI 0,569 – 0,845; p = 0,007).



**Figura 129. Curva ROC del modelo pronóstico con Hb2, LMR2 y PLR2**

Dada la importancia de la afectación ganglionar como factor pronóstico, decidimos agregar el número de ganglios metastásicos al modelo (Nx), para aumentar su capacidad pronóstica (AUC = 0,84; IC del 95 %: 0,74–0,94; p < 0,001) (Figura 130).



**Figura 130. Curva ROC del modelo pronóstico con Hb2, LMR2, PLR2 y Nx**

#### 4.2.4.2. Análisis de factores predictivos

Como segundo objetivo, decidimos explorar la capacidad predictiva de respuesta a la QRT de todas las variables analizadas. Para ello dividimos la muestra en dos grupos en función del tipo de respuesta patológica obtenida tras la cirugía: GRT 0-1: respuesta completa o casi completa. GRT 2-3: respuesta parcial o respuesta pobre/sin respuesta.

En el análisis univariante de las variables al diagnóstico y hasta la cirugía (Tabla 115) encontramos que únicamente CEA, CA19.9 y el número de ganglios afectados tras la cirugía presentaban significación estadística.

<b>Tabla 115. Análisis univariante de las variables por GRT.</b>			
<b>Variable</b>	<b>GRT 0-1</b>	<b>GRT 2-3</b>	<b>p-valor</b>
Nº de pacientes, n (%)	28 (36)	46 (60)	
Edad al diagnóstico (media/ds)	61/9,7	63,8/10,2	0,234
Hombres/Mujeres (n)	35/11	20/8	0,428
HSP/FHC (n)	26/2	41/5	0,703
cT2N1, n (%)	2 (7,1)	2 (4,3)	0,631
cT3N0, n (%)	11 (39,3)	19 (41,3)	1,000
cT3N1, n (%)	12 (42,9)	20 (43,5)	1,000
cT3N2, n (%)	2 (7,1)	2 (6,5)	1,000
cT4N0, n (%)	1 (3,6)	1 (2,2)	1,000
cT4N1, n (%)	0	0	-
cT4N2, n (%)	0	1 (2,2)	1,000
Estadio cTNM>T3N0, n (%)	44 (63)	26 (37)	0,631
G1 pre, n (%)	6 (21)	1 (2)	<b>0,010</b>
G2 pre, n (%)	19 (34)	37 (66)	0,269
G3 pre, n (%)	3 (11)	8 (17)	0,518
MSI, n (%)	2 (7)	6 (13)	0,702
Mutaciones en KRAS, n (%)	4 (14)	14 (30)	0,164
LARC bajo (0-5cm), n (%)	12 (36)	21 (64)	1,000
LARC medio (6-10cm), n (%)	14 (44)	18 (56)	0,469
LARC superior (11-15cm), n (%)	2 (22)	7 (78)	0,468
Tabaquismo, n (%)	15 (38)	25 (62)	1,000
CEA, ng/mL (media/dt)	7,5/13,9	11,8/16,2	0,068
CA19.9, ng/mL (media/ds)	15,3/14,7	22,5/23,2	0,184
5-FU/LVic, n (%)	17 (61)	34 (74)	0,302
Capecitabina, n (%)	11 (39)	11 (24)	0,195
DDQRT, días (media/ds)	55,4/16,1	52,0/17,5	0,405

**Abreviaturas:** HSP: Hospital San Pedro. FHC: Fundación Hospital Calahorra MSI: inestabilidad de microsatélites. LARC: carcinoma de recto localmente avanzado. DDQRT: tiempo transcurrido desde el diagnóstico al inicio de la QRT. ds: desviación típica o estándar.

En el análisis univariante de las variables AP (Tabla 116) que el grupo con peor GRT se asociaba con menor tasas de pCR, mayor invasión linfática y perineural y mayor N+.

<b>Tabla 116. Análisis univariante variables patológicas.</b>			
<b>Variable</b>	<b>GRT 0-1</b>	<b>GRT 2-3</b>	<b>p-valor</b>
Nº de pacientes, n (%)	28 (36)	46 (60)	
DQRTCX, días (media/ds)	49,5/11,7	46,4/9,6	0,214
DDCX, días (media/ds)	144,9/22,3	137,3/20,9	0,145
AAP, n (%)	12 (36)	21 (64)	1,000
ypT0N0, n (%)	7 (25)	0	<b>0,010</b>
ypT1N0, n (%)	3 (11)	3 (6)	0,667
ypT2N0, n (%)	9 (32)	13 (28)	0,796
ypT2N1, n (%)	0	3 (6)	0,285
ypT2N2, n (%)	0	2 (4)	0,523
ypT3N0, n (%)	5 (18)	11 (24)	0,772
ypT3N1, n (%)	3 (11)	7 (15)	0,773
ypT3N2, n (%)	1 (4)	6 (13)	0,242
ypT4N0, n (%)	0	0	-
ypT4N1, n (%)	0	1 (2)	1,000
ypT4N2, n (%)	0	0	-
Estadio ypTNM>T3N0, n (%)	9 (26)	25 (74)	0,092
GRT0, n (%)	7 (100)	0	<b>0,001</b>
GRT1, n (%)	21 (100)	0	<b>0,000</b>
GRT2, n (%)	0	33 (100)	<b>0,000</b>
GRT3, n (%)	0	13 (100)	<b>0,001</b>
G1 post, n (%)	3 (17)	4 (9)	0,404
G2 post, n (%)	13 (72)	35 (79)	0,524
G3 post, n (%)	2 (11)	5 (11)	1,000
EMVI, n (%)	1 (14)	6 (86)	0,408
Invasión linfática, n (%)	0	9 (100)	<b>0,022</b>
Invasión perineural, n (%)	3 (21)	11 (79)	0,349
Afectación ganglionar (ypN+), n (%)	3 (16)	16 (84)	<b>0,028</b>
ypN0, n (%)	25 (89)	30 (65)	<b>0,028</b>
ypN1a, n (%)	1 (4)	3 (6)	1,000
ypN1b, n (%)	1 (4)	6 (13)	0,242
ypN2a, n (%)	0	3 (6)	0,285
ypN2b, n (%)	1 (4)	4 (9)	0,644
Nº ganglios positivos (media/ds)	0,3/1,4	1,9/4,8	<b>0,022</b>
Nº ganglios resecaos (media/ds)	9,3/5,8	9,2/6,3	0,968

**Abreviaturas:** DQRTCX: tiempo fin de QRT - cirugía. DDCX: tiempo diagnóstico - cirugía. AAP: amputación abdomino-perineal. GRT: grado de regresión tumoral. EMVI: invasión vascular extramural. ds: desviación típica o estándar.

En el análisis univariante de las variables bioquímicas (Tabla 117) encontramos diferencias estadísticamente significativas con la variable bilirrubina.

<b>Tabla 117. Análisis univariante de los parámetros bioquímicos al diagnóstico.</b>			
<b>Variable</b>	<b>GRT 0-1</b>	<b>GRT 2-3</b>	<b>p-valor</b>
Número de pacientes, n (%)	28 (36)	46 (60)	
Glucosa (media/ds), mg/dL.	103,4/18,6	115,6/47,6	0,458
Urea (media/ds), mg/dL.	40,3/13,4	33,0/10,3	<b>0,035</b>
Creatinina (media/ds), mg/dL.	0,9/0,2	0,8/0,2	0,294
Ácido úrico (media/ds), mg/dL.	5,3/1,9	5,0/1,5	0,604
Sodio (media/ds), mEq/L.	142,7/2,4	142/2,9	0,164
Potasio (media/ds), mEq/L.	4,6/0,4	4,4/0,3	0,088
Triglicéridos (media/ds), mg/dL.	99/42,0	109,5/39,2	0,407
Colesterol total (media/ds), mg/dL.	201,5/42,2	201,6/42,2	0,995
HDL-Colesterol (media/ds), mg/dL.	47,3/10,6	59,8/10,6	0,109
LDL-Colesterol (media/ds), mg/dL.	114,2/36,6	122,0/31,5	0,545
LDH (media/ds), U/L.	237,9/103,9	279,5/83,8	0,091
GOT (media/ds), U/L.	18,2/4,8	20,2/9,0	0,452
GPT (media/ds), U/L.	16,0/6,6	18,9/10,4	0,478
GGT (media/ds), U/L.	24,7/13,1	39,0/62,9	0,318
Bilirrubina (media/ds), mg/dL.	0,4/0,2	0,5/0,2	<b>0,001</b>
FA (media/ds), U/L.	77,5/22,1	84,5/56,7	0,679
Ferritina (media/ds), mcg/L.	98,4/82,8	153,5/117,1	0,131
Hierro (media/ds), mcg/L.	69,5/38,9	76,1/42,4	0,587
Calcio (media/ds), mg/dL.	9,5/0,35	12,5/15,3	0,629
Proteínas totales (media/ds), mg/dL.	7,1/0,3	7,0/0,3	0,452
Albúmina (media/ds), mg/dL.	4,6/1,2	4,3/0,2	0,248

Rangos de normalidad: glucosa: 70 – 100mg/dL; urea: 10 – 50mg/dL; creatinina: 0,50 – 0,90mg/dL; ácido úrico: mg/dL; sodio: 135 – 148mmol/L; potasio: 3,6 – 5,1 mol/L; triglicéridos: 0 - 200mg/dL; colesterol:100 - 200mg/dL; HDL-CT: 45 - 110mg/dL; LDL-CT: 90 - 160mg/dL; LDH: 120 – 250 U/L; GOT: 0 – 40U/L; GPT: 0 – 40U/L, GGT: 6 – 42U/L; bilirrubina: 0,0 – 1,2mg/dL; FA: 35 – 104U/L; ferritina: 25 – 310 µcg/dL; hierro: 34 – 172µg/dL calcio: 8,0 – 11,0mg/dL.; proteínas: 6,2 – 8,4g/dL; albúmina: 3,5 – 4,9g/dL. ds: Desviación típica o estándar.

En el análisis univariante de las variables hematológicas (Tablas 118 y 119) solo utilizamos los resultados de las dos primeras extracciones, no encontramos ninguna diferencia entre ambos grupos.

<b>Tabla 118. Análisis univariante de los parámetros hematológicos según el GRT.</b>			
<b>Parámetro</b>	<b>GRT 0-1</b>	<b>GRT 2-3</b>	<b>p-valor</b>
Leucocitos 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	7803,2/1936,4	7573,4/2027,1	0,634
Leucocitos 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	5662,8/2047,2	5048,8/1581,6	0,276
Neutrófilos 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	4471,6/1096,1	4602,4/1580,9	0,717
Neutrófilos 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	3787,5/1758,7	3365,1/1402,8	0,451
Linfocitos 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	2384,8/913,3	2136,5/787,9	0,393
Linfocitos 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	1070/572,4	923,2/369,5	0,478
Monocitos 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	638/233,3	619,0/205,5	0,941
Monocitos 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	574,6/190,1	516,2/167,5	0,283
Hemoglobina 1 (media/ds), g/dL	13,7/1,4	13,9/1,9	0,341
Hemoglobina 2 (media/ds), g/dL	13,1/1,5	13,3/1,5	0,693
Plaquetas 1 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	238120,0/47437,9	245634,1/70034,1	0,606
Plaquetas 2 (media/ds), c/mm <sup>3</sup>	217392,8/56107,9	221697,6/71094,0	0,800

Rangos de normalidad: leucocitos: 4.000 – 10.000; neutrófilos: 1.900 – 8.000; linfocitos: 900 – 5.200; monocitos: 0 – 1.000.; hemoglobina: 13,5g/dL– 17,5g/dL; plaquetas: 150.000 – 425.000. ds: desviación típica o estándar.

<b>Tabla 119. Análisis univariante de las ratios según el GRT.</b>			
<b>Variable</b>	<b>GRT 0-1</b>	<b>GRT 2-3</b>	<b>p-valor</b>
Ratio Neutrófilo/Linfocito 1 (media/ds)	2,0/0,8	2,4/1,3	0,471
Ratio Neutrófilo/Linfocito 2 (media/ds)	4,2/2,4	4,4/3,3	0,809
Ratio Linfocito/Monocito 1 (media/ds)	3,9/1,4	3,6/1,5	0,497
Ratio Linfocito/Monocito 2 (media/ds)	1,9/1,0	2,0/1,5	0,791
Ratio Plaquetas/Linfocito 1 (media/ds)	111,8/44,8	130,6/63,7	0,186
Ratio Plaquetas/Linfocito 2 (media/ds)	257,5/136,8	300,5/231,0	0,729

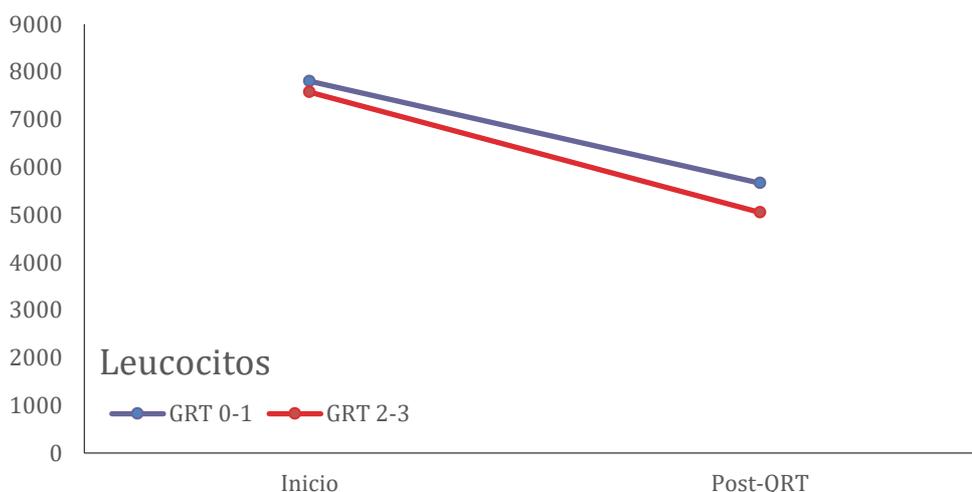
ds: desviación típica o estándar.

#### 4.2.4.2.1. Cinética de los parámetros hematológicos

En el análisis predictivo, también realizamos la representación gráfica de las medias de cada parámetro hematológico y de las ratios. En este caso, únicamente utilizamos las dos primeras determinaciones del “*timing*” (al diagnóstico y tras la QRT neoadyuvante).

##### 4.2.4.2.1.1. Leucocitos

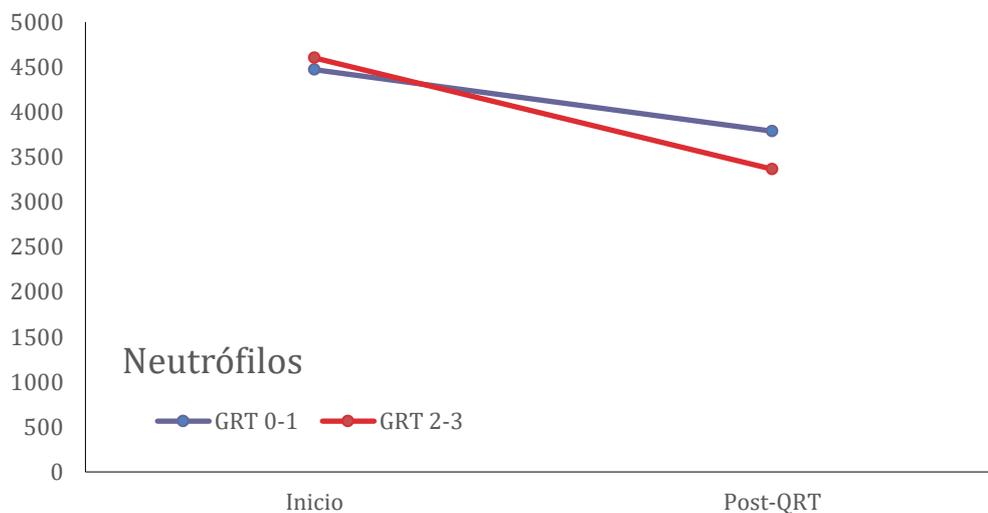
La tendencia de los leucocitos es a disminuir tras la QRT sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 131).



**Figura 131. Evolución de los niveles de leucocitos (media, c/mm<sup>3</sup>).**

##### 4.2.4.2.1.2. Neutrófilos

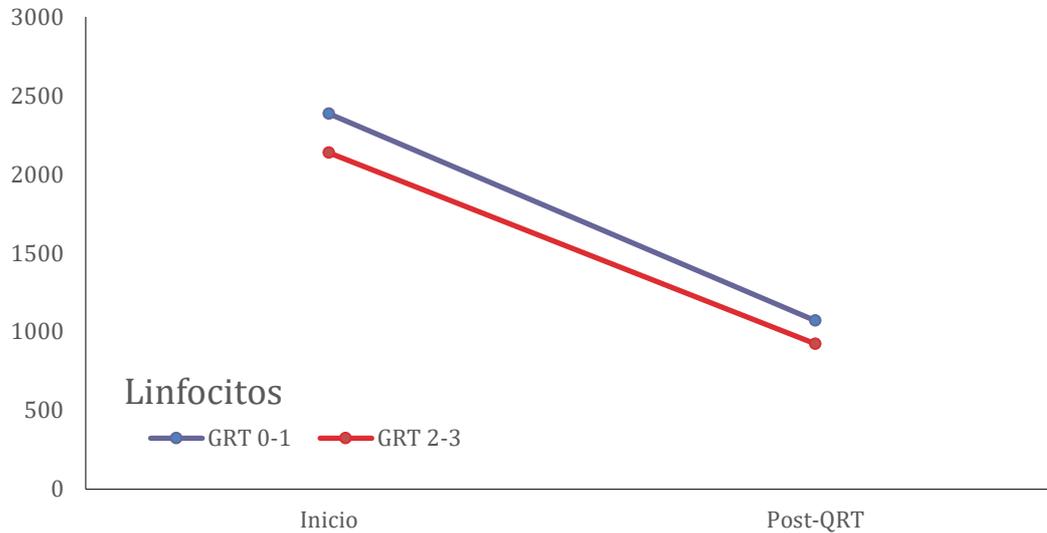
La tendencia de los neutrófilos es similar a la de los leucocitos y sigue una tendencia descendente en ambos grupos más pronunciada en el grupo GRT 2-3 (Figura 132).



**Figura 132. Evolución de los niveles de neutrófilos (media, c/mm<sup>3</sup>) en función del GRT.**

#### 4.2.4.2.1.3. Linfocitos

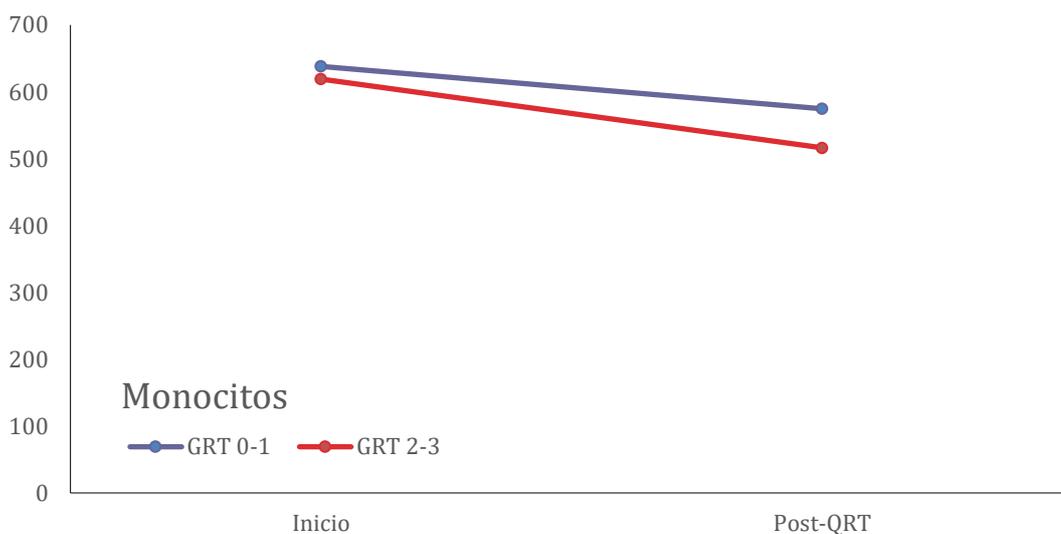
La tendencia de los linfocitos también es decreciente, aunque parece ambos grupos, ligeramente superior para el grupo con mejor respuesta patológica (Figura 133).



**Figura 133. Evolución de los niveles de linfocitos (media, c/mm<sup>3</sup>) en función del GRT**

#### 4.2.4.2.1.4. Monocitos

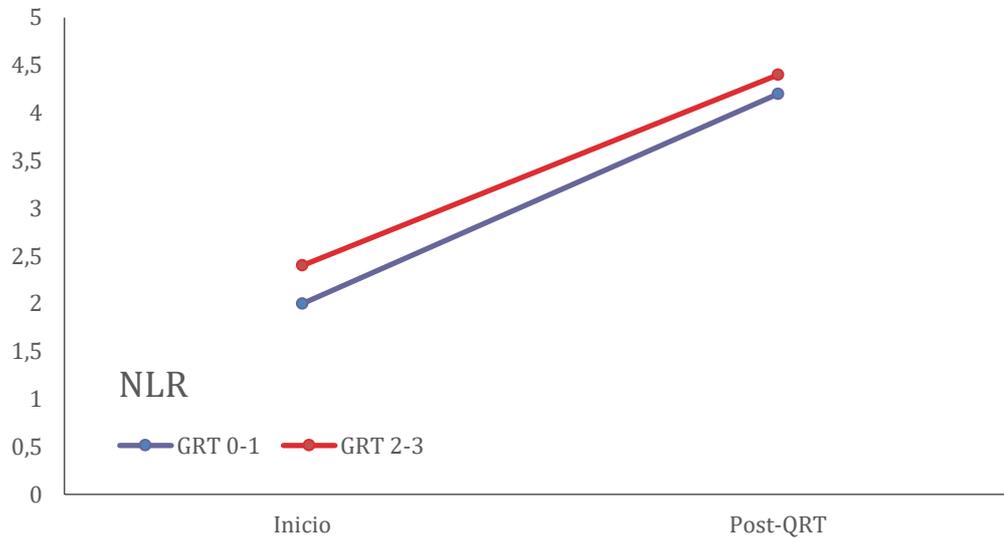
La tendencia de los monocitos también es decreciente, aunque parece que en el grupo de peor respuesta la caída es más profunda (Figura 134).



**Figura 134. Evolución de los niveles de monocitos (media, c/mm<sup>3</sup>) en función del GRT.**

#### 4.2.4.2.1.5. Ratio neutrófilo/linfocito (NLR)

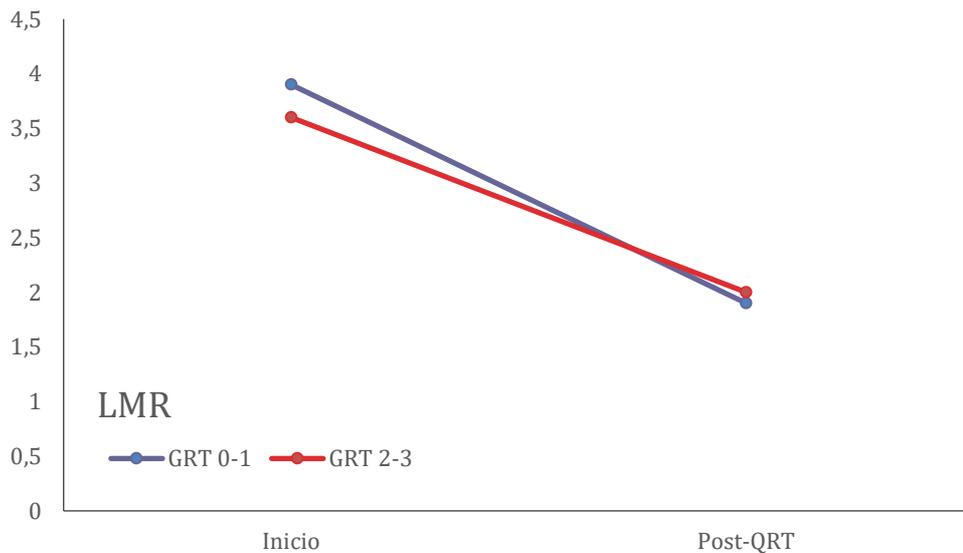
La tendencia del NLR es a aumentar tras la QRT. Las rectas en ambos grupos discurren prácticamente de manera paralela (Figura 135).



*Figura 135. Evolución de los niveles de la ratio NLR en función del GRT.*

#### 4.2.4.2.1.6. Ratio linfocito/monocito (LMR)

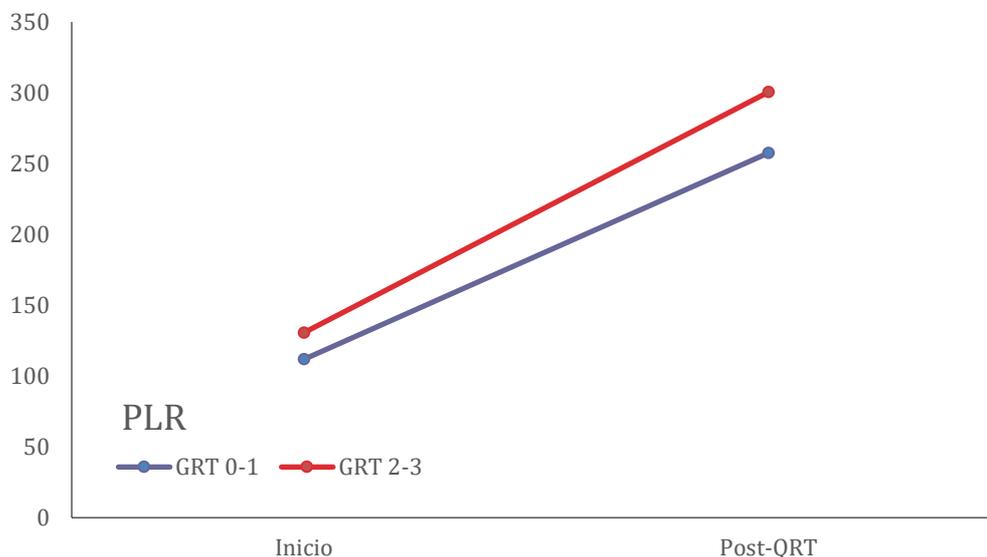
La tendencia del LMR es descendente y ambas rectas discurren de manera paralela entrecruzándose tras la QRT, aunque sin diferencias significativas (Figura 136).



*Figura 136. Evolución de los niveles de la ratio LMR en función del GRT.*

#### 4.2.4.2.1.7. Ratio plaquetas/linfocitos (PLR)

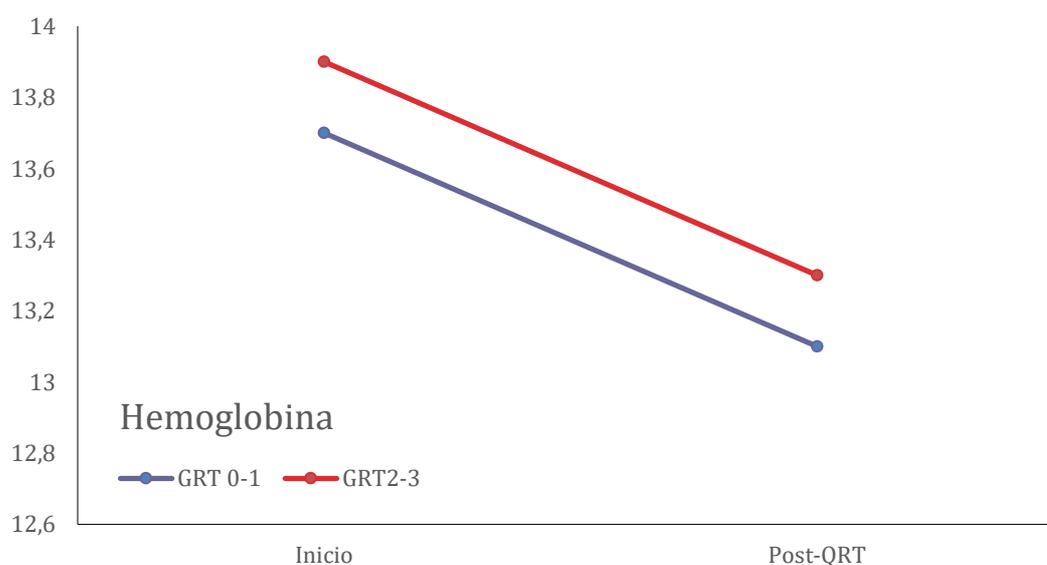
La tendencia del PLR es a aumentar de manera exponencial. A pesar de tener recorridos paralelos, el PLR se mantiene de manera constante en medias superiores en el grupo de recaída (Figura 137).



**Figura 134. Evolución de los niveles de la ratio PLR en función del GRT.**

#### 4.2.4.2.1.8. Hemoglobina (Hb)

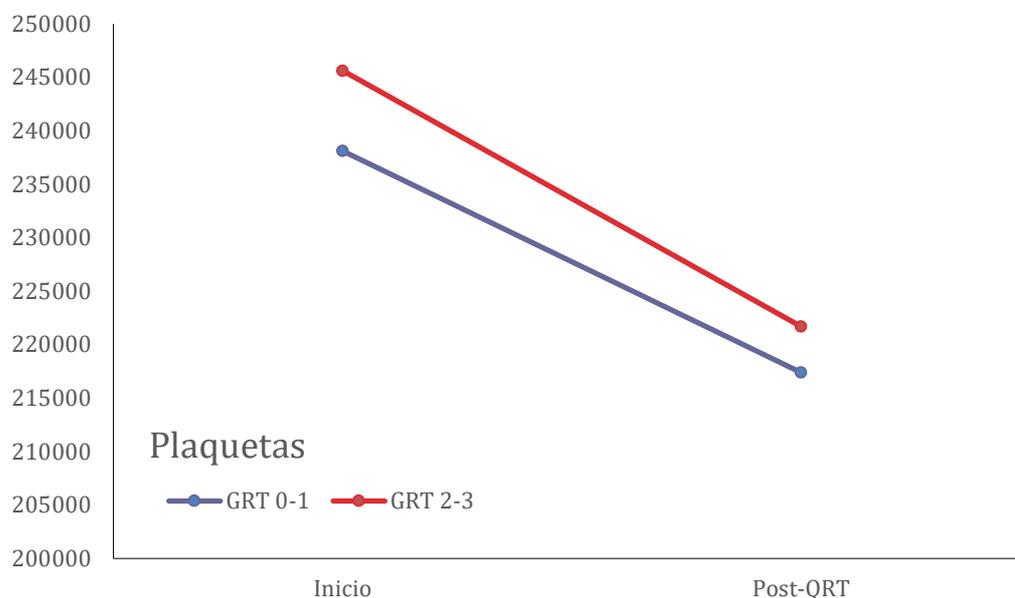
Los niveles de hemoglobina descienden desde el inicio para ambos grupos de manera paralela, si bien los niveles basales del grupo con peor respuesta son claramente superiores a los del grupo de mejor respuesta (Figura 138).



**Figura 138. Evolución de los niveles de hemoglobina (media, g/dL) en función del GRT.**

#### 4.2.4.2.1.9. Plaquetas

Los niveles de plaquetas descienden de manera constante para ambos grupos, aunque el grupo de mejor respuesta patológica parte de medias inferiores al de peor respuesta (Figura 139).



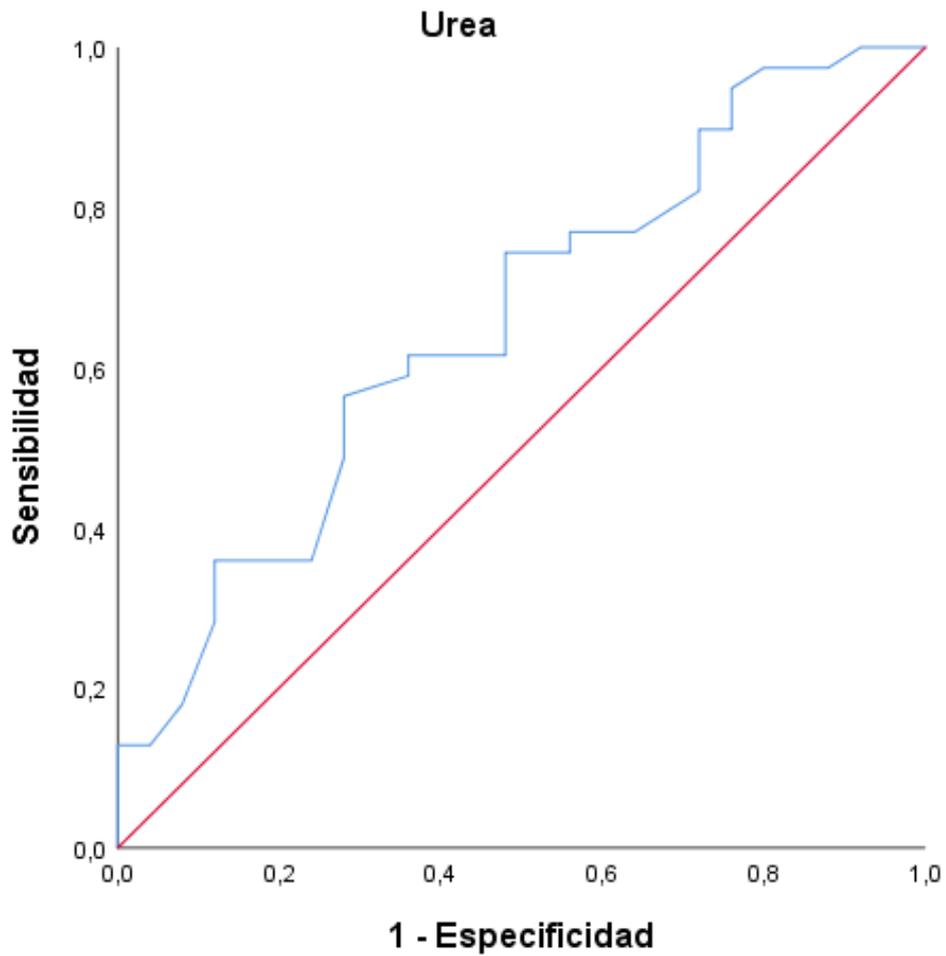
*Figura 139. Evolución de los niveles de plaquetas (media, c/mm<sup>3</sup>) en función del GRT.*

#### 4.2.4.2.2. Cálculo del índice de Youden de las variables bioquímicas de interés

En el análisis univariante de las variables hematológicas, objetivamos diferencias estadísticamente significativas únicamente en los niveles de bilirrubina ( $p = 0,001$ ) y de urea ( $p = 0,035$ ). Decidimos por tanto calcular el punto de corte ideal para ambas variables a través del índice de Youden.

##### 4.2.4.2.2.1. Cálculo del índice de Youden para la urea

La curva ROC para la variable urea (Figura 140) demostró tener una pobre capacidad discriminadora ( $AUC = 0,65$ ; IC 95 % 0,52 – 0,79;  $p = 0,035$ ) (Tabla 120). Gracias a la tabla de coordenadas de la curva, determinamos que el punto de corte ideal para la urea era de 0,66mg/dL (Tabla 121).



*Figura 140. Curva ROC del modelo predictivo con la variable Urea.*

<b>Tabla 120. Área bajo la curva de urea</b>				
<b>Área</b>	<b>Desv. Error</b>	<b>Significación asintótica</b>	<b>95% de intervalo de confianza</b>	
			<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>
0,657	0,070	0,035	0,520	0,794

**Tabla 121. Sensibilidad, especificidad e índice de Youden (color canela) para la urea**

Urea	TVP	TFP	TVN	Youden Index
	Sensibilidad	1 - Especificidad	Especificidad	
0	1	1	0	0
0,2305558	1	0,96	0,04	0,04
0,2877244	1	0,92	0,08	0,08
0,3041347	0,974	0,88	0,12	0,094
0,3517267	0,974	0,84	0,16	0,134
0,4000683	0,974	0,8	0,2	0,174
0,4128083	0,949	0,76	0,24	0,189
0,4256661	0,923	0,76	0,24	0,163
0,4386253	0,897	0,76	0,24	0,137
0,4648276	0,897	0,72	0,28	0,177
0,4911274	0,846	0,72	0,28	0,126
0,5109236	0,821	0,72	0,28	0,101
0,530697	0,795	0,68	0,32	0,115
0,543826	0,769	0,64	0,36	0,129
0,5568944	0,769	0,56	0,44	0,209
0,5763058	0,744	0,56	0,44	0,184
0,5955615	0,744	0,48	0,52	0,264
0,6082155	0,718	0,48	0,52	0,238
0,6207258	0,615	0,48	0,52	0,135
0,6330777	0,615	0,44	0,56	0,175
0,6452572	0,615	0,36	0,64	0,255
0,6572513	0,59	0,36	0,64	0,23
<b>0,6690479</b>	<b>0,564</b>	<b>0,28</b>	<b>0,72</b>	<b>0,284</b>
0,6806359	0,487	0,28	0,72	0,207
0,6920049	0,359	0,24	0,76	0,119
0,7031457	0,359	0,16	0,84	0,199
0,7140501	0,359	0,12	0,88	0,239
0,7247108	0,308	0,12	0,88	0,188
0,7351216	0,282	0,12	0,88	0,162
0,745277	0,179	0,08	0,92	0,099
0,7551728	0,128	0,04	0,96	0,088
0,7694223	0,128	0	1	0,128
0,7832723	0,077	0	1	0,077
0,7921038	0,051	0	1	0,051
0,8086965	0,026	0	1	0,026
1	0	0	1	0

#### 4.2.4.2.2. Cálculo del índice de Youden para la bilirrubina

En el análisis univariante únicamente encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de bilirrubina basal entre ambos grupos ( $p = 0,001$ ). Calculamos la curva ROC de los niveles de bilirrubina como variable para discriminar una buena o mala respuesta a la QRT neoadyuvante. La curva ROC de la bilirrubina demostró una aceptable capacidad predictiva para discriminar la respuesta a la QRT neoadyuvante (AUC = 0,75; 95% CI 0,62 – 0,88;  $p = 0,001$ ) (Figura 141; Tabla 122). Gracias a la tabla de coordenadas de la curva, determinamos que el punto de corte de la bilirrubina era también de 0,66mg/dL (Tabla 123).

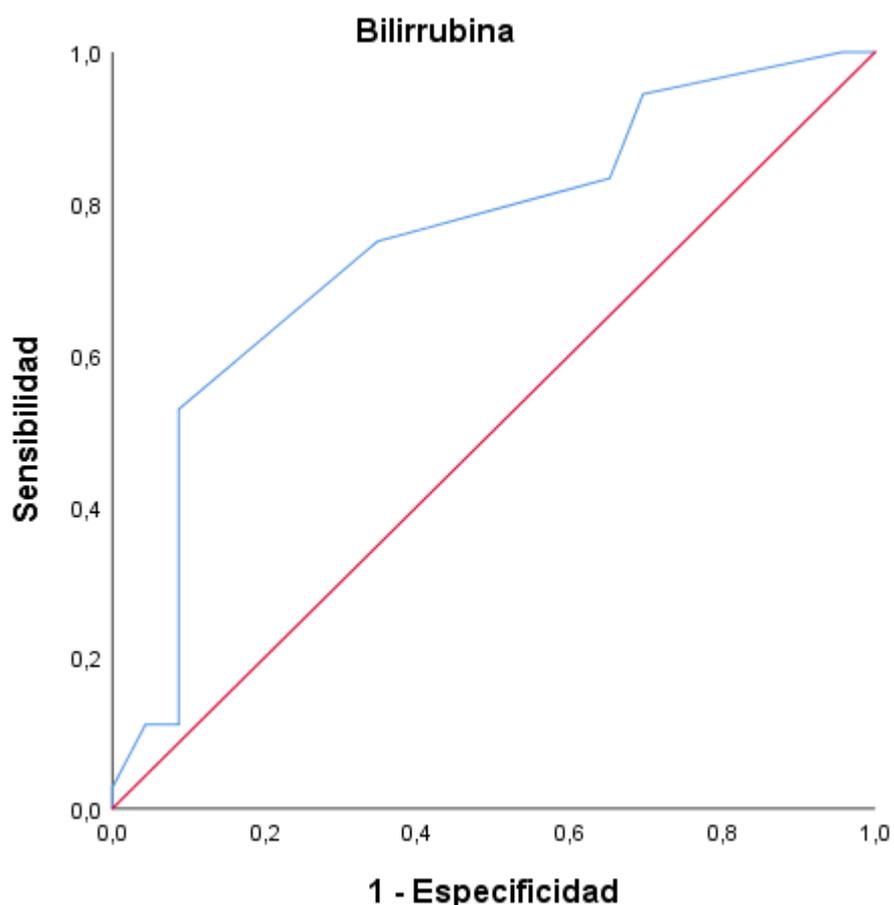


Figura 141. Curva ROC del modelo predictivo con la variable bilirrubina.

Tabla 122. Área bajo la curva de Bilirrubina				
Área	Desv. Error	Significación asintótica	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
0,751	0,066	0,001	0,621	0,882

<b>Tabla 123. Sensibilidad, especificidad e índice de Youden (color fucsia) para bilirrubina (Bi)</b>				
<b>Bilirrubina</b>	<b>TVP</b>	<b>TFP</b>	<b>TVN</b>	<b>Youden Index</b>
	<b>Sensibilidad</b>	<b>1 - Especificidad</b>	<b>Especificidad</b>	
0,0000	1,000	1,000	0,000	0,000
0,3196	1,000	0,957	0,043	0,043
0,3759	0,944	0,696	0,304	0,249
0,4739	0,833	0,652	0,348	0,181
0,5739	0,750	0,348	0,652	0,402
<b>0,6683</b>	<b>0,528</b>	<b>0,087</b>	<b>0,913</b>	<b>0,441</b>
0,7509	0,333	0,087	0,913	0,246
0,8187	0,167	0,087	0,913	0,080
0,8712	0,111	0,087	0,913	0,024
0,9102	0,111	0,043	0,957	0,068
0,9383	0,028	0,000	1,000	0,028
1,0000	0,000	0,000	1,000	0,000

#### 4.2.4.2.3. Regresión logística y modelos predictivos de respuesta a QRT

Con los resultados del análisis univariante, decidimos crear un modelo pronóstico sobre la variable respuesta (medida en función del GRT), utilizando el punto de corte para transformar las dos variables con significación estadística (bilirrubina y urea) en dicotómicas (Tabla 124).

<b>Tabla 124. Regresión logística</b>						
<b>Variable</b>	<b>B</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Wald</b>	<b>gl</b>	<b>p</b>	<b>Exp (B)</b>
Bilirrubina>0,66mg/dL	2,575	0,969	7,067	1	0,008	13,130
Urea>0,66ng/mL	1,371	0,810	2,860	1	0,091	3,937

Con estos resultados se diseñó un modelo predictivo que incluía ambas variables (Figura 142), pero no se observó ninguna mejora en la capacidad de discriminación en comparación con la bilirrubina (AUC = 0,74; IC 95% 0,61-0,88; p = 0,001) (Tabla 125).

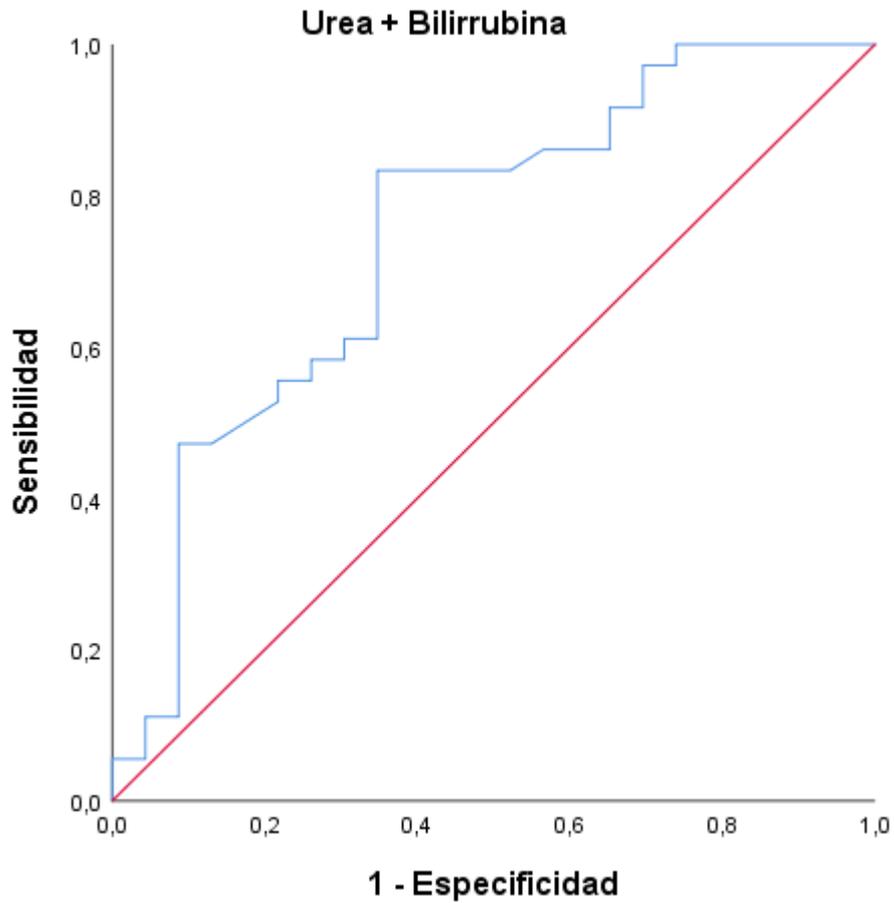


Figura 142. Curva ROC del modelo pronóstico para bilirrubina y urea

<b>Tabla 125. Área bajo la curva de urea y bilirrubina</b>				
<b>Área</b>	<b>Desv. Error</b>	<b>Significación asintótica</b>	<b>95% de intervalo de confianza</b>	
			<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>
0,747	0,068	0,001	0,614	0,880



## 5. DISCUSIÓN

---



## 5. Discusión

El CCR es un problema de salud global ya que supone la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial (2) con una incidencia creciente (7,534,6) en las últimas décadas fundamentalmente en los países occidentales, y asociado al estilo de vida (133,135,137), la obesidad (138,139,141,146,148) y los hábitos dietéticos (150,151). Únicamente en torno al 10% de todos los casos se asocian a predisposición hereditaria por mutaciones patogénicas en la línea germinal (535).

El CR supone alrededor del 30-40% de todos los casos de CCR y, por su localización anatómica dentro de la pelvis (25), requiere un abordaje terapéutico especial que incluye el tratamiento neoadyuvante con radioterapia asociada o no a quimioterapia (266,536) y cirugía basada en la escisión total del mesorrecto (237,236). El tratamiento de QRT preoperatoria es uno de los tratamientos estándar que pueden utilizarse en el contexto del abordaje neoadyuvante del LARC.

La búsqueda de biomarcadores predictivos (capaces de predecir la respuesta a la QRT) y pronósticos (de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global) que nos permitan individualizar el tratamiento de cada uno de los pacientes es un imperativo en la investigación oncológica actual. Se han descrito biomarcadores clínicos (309,313,315,316,318), moleculares (297,387,389,390,392,396–398,401), de imagen (324,325,328,330,333), histopatológicos (483,484,490,496,498,499) y analíticos (343,345,347,363,537–539) que de manera aislada nos proporcionan información relevante en este sentido.

En el presente estudio analizamos las características biológicas y moleculares de una cohorte de pacientes con LARC con el objetivo de encontrar estos biomarcadores.

### **5.1. Discusión de la estadística descriptiva, diseño y metodología**

Respecto a las características demográficas de la población, destaca una edad media al diagnóstico de 62,4 años y un predominio en varones (73,9%). Las tasas de incidencia descritas en la literatura reportan una mediana de edad de 71 años con un 65% de pacientes con más de 65 años y un predominio en hombres más pronunciado en los mayores de 65 años (ratio hombre/mujer: 1.70) frente a la población más joven (ratio hombre/mujer 1.50) (540)

En nuestra muestra nos encontramos con una media de edad menor en la cohorte de exploración (59,9 años) en comparación con la de la cohorte de validación (65,3 años) con diferencias estadísticamente significativas. Siendo el reclutamiento de esta última cohorte posterior en el tiempo, contrasta con la tendencia actual en las dos últimas décadas de un descenso paulatino pero progresivo de la edad media al diagnóstico en CCR y rectal (541–544).

Aunque consideramos que las características de nuestra muestra son representativas de esta enfermedad, estas diferencias de edad pueden haber influido en nuestros resultados puesto que parece que las características biológicas y pronósticas del diagnóstico de cáncer de recto a una edad más joven son diferentes (545,546) por lo que estas diferencias pueden haber influido en nuestros resultados.

Respecto al análisis estadístico, hemos utilizado modelos logísticos multivariados en vez de modelos multivariados de supervivencia (regresión de Cox) que podría haber sido también una manera de analizarlo (ya que la variable es el tiempo hasta la recaída o la respuesta). Sin embargo, nuestro objetivo era encontrar puntos de corte con curvas ROC, y para ello los modelos logísticos son los ideales.

En cuanto al tamaño de la muestra, en los análisis univariados encontramos suficiente potencia como para encontrar diferencias significativas en varias de las comparaciones. Por ejemplo, para las comparaciones de medias de los valores de hemoglobina entre los grupos con recaída (n = 32) y sin recaída (n = 45), la potencia fue del 84% para diferencias iguales o superiores a 1,1. Para PLR2, la potencia fue del 86% para diferencias superiores a 150 o más.

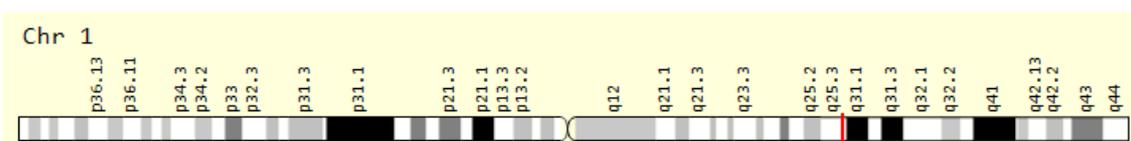
Ciertamente, para la regresión logística, la recomendación para el cálculo del tamaño muestral es que existan diez eventos por cada covariable (547). En nuestro caso, contábamos con 32 pacientes en el grupo de recaída, por lo que los modelos tendrían que haber utilizado un máximo de 3 covariables. Nosotros empleamos el estatus de KRAS y 7 covariables (tabla 113). Aunque los intervalos de confianza de los odds ratios son amplios, no hubo problemas de convergencia del modelo.

## 5.2. Discusión de las fases de exploración y validación

Tras el análisis bioinformático identificamos 5 genes cuya expresión diferencial permitía discriminar de manera estadísticamente significativa la recaída por LARC: ENSG00000116406, ENSG00000205918, ENSG00000230176, ENSG00000269937 y ENSG00000270993. De ellos, solo EDEM3 (ENSG00000116406) y LINC01433 (ENSG00000230176) eran conocidos mientras que los demás no están caracterizados en el momento actual.

### 5.2.1. EDEM3

La proteína EDEM3 pertenece al sistema de proteínas denominado EDEMs (*Endoplasmic reticulum Degradation-Enhancing  $\alpha$ -Manosidase-like proteins*) que participa en la degradación de las glicoproteínas en el retículo endoplásmico. El gen de EDEM3 se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q25.3). Tiene un tamaño de 64.671 bases y la proteína que codifica consta de 932 aminoácidos (Figura 140) (548).



**Figura 140. Localización genómica de EDEM3 (banda roja) en el cromosoma 1q25.3.**

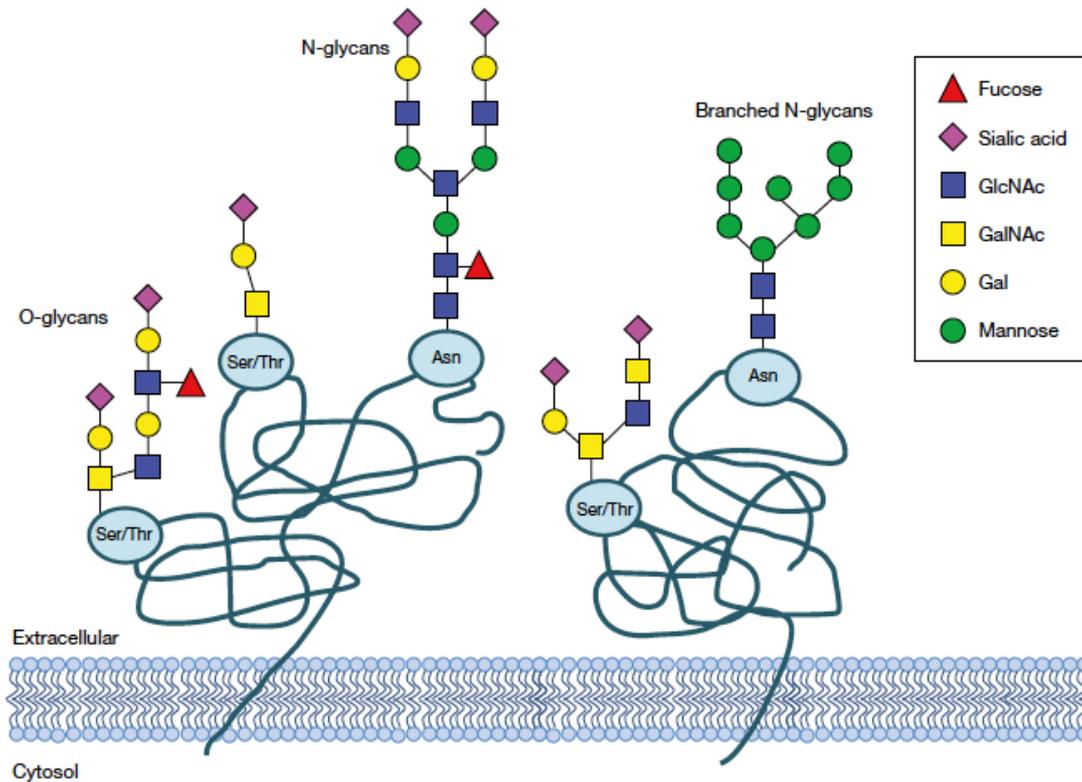
Tomado de (548).

La familia de proteínas EDEM contiene miembros clave en el sistema de degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico (ER) denominado ERAD (*ER-associated degradation*), un sistema responsable de la degradación de proteínas defectuosas (*mis-folded*) que tiene como objetivo proteger a la célula del estrés (549,550).

Todas las proteínas sintetizadas en el ER deben someterse a un mecanismo de control de calidad que garantice que todas ellas se pliegan y ensamblan correctamente, de tal manera que solo aquellas que adquieren su correcta conformación continúan su ciclo hacia la fase excretora. Durante este proceso, todas aquellas proteínas “defectuosas” como consecuencia de mutaciones o alteraciones que modifiquen su conformación normal son degradadas a través de la vía ERAD (549).

Una vez que los ribosomas sintetizan un péptido destinado a la secreción, tiene lugar un proceso enzimático en el aparato de Golgi y el ER por el que se consigue la unión de residuos de azúcar denominados glicanos o polisacáridos a otros glúcidos, lípidos o proteínas. Este proceso se denomina glicosilación (551). Los dos mecanismos más frecuentes de glicosilación se denominan O–glicosilación y N–glicosilación.

La N–glicosilación consiste en la adición de un oligosacárido (una cadena de 14 monosacáridos) de complejidad variable al grupo amida de un residuo proteico de asparagina. La O–glicosilación se fundamenta en la adición de moléculas de azúcar de manera secuencial al grupo hidroxilo de los residuos proteicos de serina/treonina (Figura 141). El número de glicosilaciones que presenta la proteína diana determinará su expresión y actividad específica dentro de la célula o el tejido (551,552).



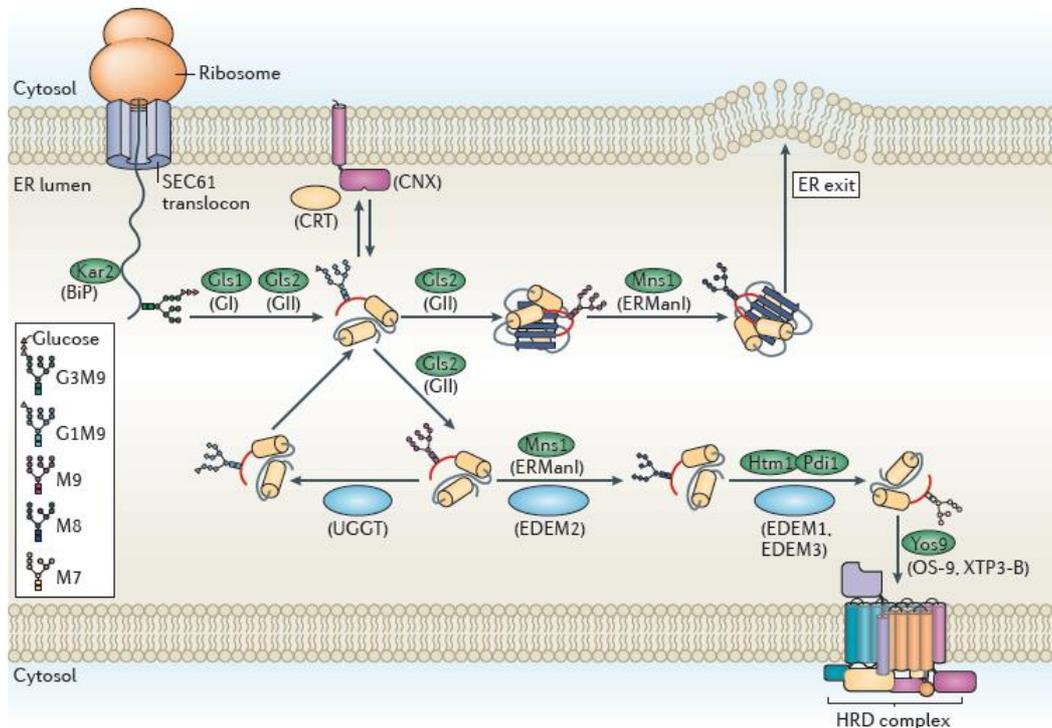
**Figura 141. O y N-glicanos unidos a proteínas en la membrana. Tomado de (552).**

El sistema de control de calidad de las glicoproteínas se basa en el complejo proteico calnexina/calreticulina (CNX/CRT) de la familia de las chaperonas, que interacciona con la glicoproteína recién formada y finaliza tras la eliminación de un residuo de glucosa por parte de la glucosidasa II. Aquellas glicoproteínas correctamente plegadas serán liberadas al citosol. En caso de que la glicoproteína no esté correctamente plegada, es

reconocida como sustrato por la enzima UDP-glucosa-glicoprotein glucosiltransferasa (UGGT1), que realiza una “re-glicosilación” añadiéndole un nuevo residuo de glucosa al glicano y permitiéndole su reintegración en el ciclo CNX/CRT (553,554) (Figura 142).

En caso de que persista la alteración en el plegamiento de la glicoproteína, una enzima denominada  $\alpha$ 1,2-manosidasa I (ERManI) eliminará un residuo de manosa del oligosacárido, permitiendo que pueda ser reconocido por el sistema de proteínas EDEM, el cual facilitará su retro-translocación al citosol para su ubiquitinización y degradación definitiva (553–555). En los mamíferos, la eliminación de residuos de manosa de los N-glicanos es crucial para la eliminación de errores en el plegamiento de las glicoproteínas.

EDEM2 y ERmanI catalizan el primer paso de la degradación eliminando un residuo de manosa de  $\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  (M9) pasando al isómero B  $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2$  (M8B). EDEM3 y EDEM1 catalizan el siguiente paso, que es la hidrolización de un segundo residuo de manosa convirtiendo M8B en  $\text{Man}_7\text{GlcNac}_2$  (M7). Los péptidos M7 son reconocidos por la lectina OS-9 en la luz del ER para transportarlos al citosol para su eliminación (556).



**Figura 142. Representación del ciclo calnexina/calreticulina. Tomado de (554).**

**Abreviaturas:** (CNX, calnexin; CRT, calreticulina; ER, endoplasmic reticulum; ERManI, ER mannosidase I; Gls, glucan synthase of cerevisiae protein; HRD, HMG-CoA reductase degradation; Kar2, karyogamy 2; Mns1, mannosidase I; Pdi1, protein disulfide isomerase; Sec61, secretory 61; Yos9, yeast osteosarcoma 9).

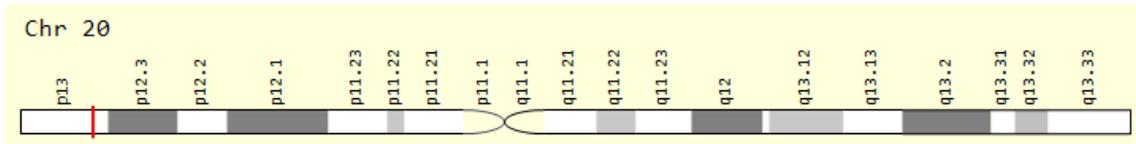
Cuando la activación del sistema ERAD se produce por un exceso de proteínas defectuosas (*mis-folded*) se puede inducir en la célula un mecanismo de respuesta adaptativa conocido como UPR (*unfolded protein response*). Este mecanismo se ha observado en células tumorales en respuesta a estímulos estresantes como el daño en el DNA o la hipoxia. El propósito del UPR es proteger a la célula del estrés (557) y con frecuencia está activado en diferentes tumores, por lo que se le ha asociado a resistencia a quimioterapia y a radioterapia (558).

La presencia de alteraciones en los procesos de glicosilación (glicosilación aberrante) en el cáncer es conocida desde 1969 (559). Desde entonces se han descrito cambios en los patrones de glicosilación de la superficie de las células, así como la secreción de glicoproteínas durante los procesos de transformación maligna y progresión tumoral; de hecho, el marcador tumoral CEA (antígeno carcinoembrionario) es una glicoproteína (560). Algunos autores consideran que la glicosilación aberrante debería ser considerada por sí misma un *hallmark* (hito) del cáncer, aunque otros defienden que es específicamente la expresión de ciertos glicanos lo que juega un papel esencial en cada mecanismo (561).

El papel de EDEM3 en cáncer está en proceso de exploración. Un estudio reciente en cáncer de próstata ha demostrado que la sobreexpresión de EDEM3 se asoció con resistencia a la radioterapia y con una peor supervivencia libre de enfermedad (557). La expresión de EDEM3 estaría ligada a la vía UPR, ya que actuaría como un mecanismo de defensa frente a estímulos estresantes del retículo endoplásmico (557). Estos resultados han dado lugar a que se plantee a EDEM3, al sistema ERAD y UPR como objetivos terapéuticos contra la que desarrollar tratamientos dirigidos que nos permitan re-sensibilizar a las células tumorales a los estímulos “estresantes” del RE (562).

### **5.2.2. LINC01433**

El gen LINC01433 (*Long Intergenic Non Protein Coding RNA 1433*) es un gen de la familia de los *long non-coding RNA* (lncRNA), es decir de RNAs que no codifican proteínas. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 20 (20p13) y tiene un tamaño de 105.871 bases (Figura 143) (563).



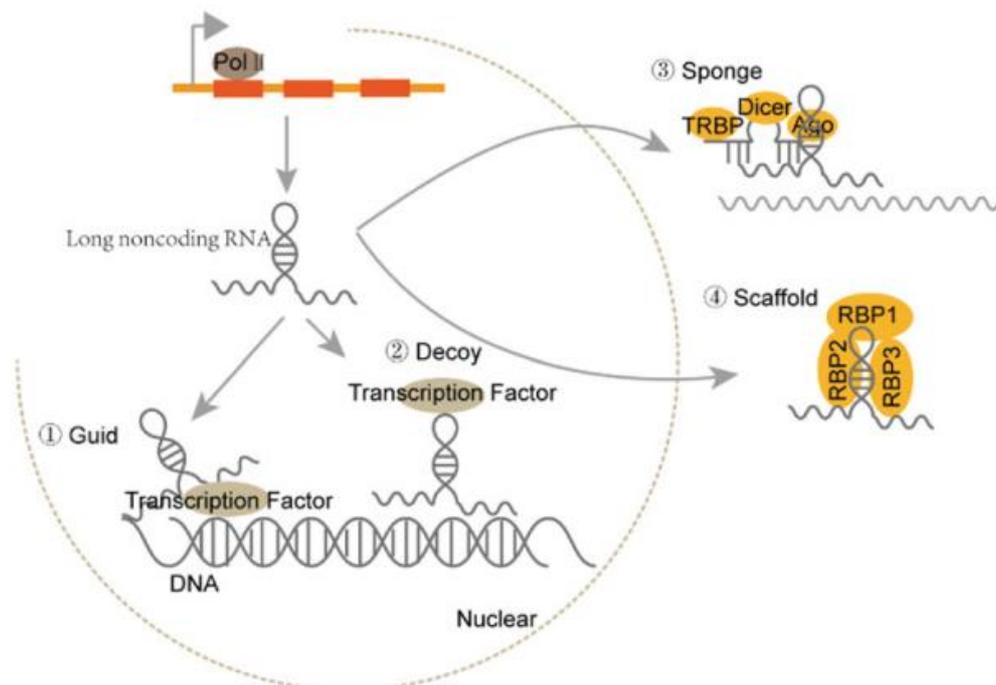
**Figura 143. Localización genómica de LINC01433 (banda roja) en el cromosoma 20p13.**

*Tomado de (563).*

Los lncRNAs regulan la transcripción y pueden actuar como oncogenes o genes supresores regulando la carcinogénesis y la progresión tumoral (564). Los lncRNAs se transcriben mediante la RNA polimerasa II con varias funciones (Figura 144):

- 1) Guía: reclutan factores de transcripción para la remodelación de la cromatina.
- 2) Señuelo: obstaculizar factores de transcripción del promotor del gen objetivo.
- 3) Esponja: para evitar la degradación del gen objetivo.
- 4) Andamio: para facilitar la interacción de proteínas asociadas.

En CCR se han descrito múltiples lncRNAs que actúan como oncogenes o genes supresores tumorales, entre otros NEAT1 (565), lnc-sox5 (566), RNA RP11-708H21.4 (567), RNA FEZF1-AS1 (568), NNT-AS1 (569), lnc-GNAT1-1 (570), LINC00959 (571), PGM5-AS1 (572), PURPL (573) y CCAT2 (574), por nombrar algunos.



**Figura 144. Biogénesis y mecanismos de acción de los lncRNAs. Tomado de (564).**

Específicamente en cáncer de recto, la sobreexpresión de LINC00461 se ha asociado a resistencia a cisplatino y su inhibición a través de la vía de la CCND1 (ciclina 1) consigue detener la progresión tumoral y recuperar su quimio-sensibilidad (575). En un estudio de 70 pacientes con LARC tratados con QRT neoadyuvante, se demostró que la sobreexpresión de LincRNA-p21 se asociaba con una peor tasa de *downstaging* y de respuesta patológica medida por GRT, así como un menor tiempo a la recaída (576). También hay autores que han sugerido la utilización de firmas de hasta tres y cinco lncRNAs con capacidad pronóstica y predictiva (577,578).

El desarrollo de las técnicas de minería de datos ha permitido aumentar la profundidad de análisis de tal manera que únicamente en un estudio con 16 pacientes con cáncer de recto se han llegado a identificar hasta 1658 perfiles diferenciales de lncRNAs (579).

LINC01433 se ha asociado con proliferación, migración, invasión y transición epitelio-mesénquima en cáncer de pulmón (580). Su sobreexpresión se ha correlacionado con una mayor probabilidad de progresión y peor pronóstico en cáncer gástrico (581), cáncer de mama (582), cáncer de esófago (583), cáncer de nasofaringe (584) y hepatocarcinoma (585), pero no ha sido descrita su implicación en cáncer de recto.

### **5.2.3. Fase de validación**

Al no demostrar la sobreexpresión de cuatro de los cinco genes del modelo, debemos reconocer su ausencia de utilidad. Sin embargo, el hecho de que EDEM3 mantuviera su sobreexpresión en el grupo de los pacientes con recaída de manera estadísticamente significativa debe considerarse un punto de partida para continuar investigando su papel en el LARC.

### **5.2.4. Consideraciones respecto a EDEM3 y LINC01433**

En nuestro estudio hemos identificado inicialmente un modelo de 5 genes (que incluyen EDEM3 y LINC0144) cuya sobreexpresión podría determinar qué pacientes cuentan con una mayor probabilidad de recaída con una AUC según la curva ROC de 0,937. Desgraciadamente, no hemos conseguido demostrar en la cohorte de validación la sobreexpresión de EDEM3 y LINC01433 y por tanto nuestro modelo no puede ser tomado en consideración.

También hemos demostrado en líneas celulares de cáncer colorrectal (HCT-116) que la sobreexpresión de EDEM3 no tenía efectos sobre la proliferación y migración de las células. Sin embargo, su silenciamiento reduce la capacidad proliferativa y migratoria

de estas células, sugiriendo un cierto mecanismo como marcadores de metástasis. Por su parte, la sobreexpresión de LINC0144 en estas células HCT-116 se asoció con una mayor tasa de proliferación precoz y de migración celular, sugiriendo un papel para este lncRNA en la metástasis tumoral.

Una de las causas que pueden justificar este resultado estriba en las diferencias en las características de ambas cohortes, ya que la primera cohorte presentó una población de un especial mal pronóstico de manera estadísticamente significativa (edad más joven al diagnóstico, invasión perineural, más recaídas y peor supervivencia libre de recaída). Además, aunque no alcanzaron la significación estadística, la cohorte de exploración presentó un mayor porcentaje de tumores pobremente diferenciados G3, de mutaciones en KRAS, o de niveles más elevados de CEA, así como un menor grado de regresión tumoral. Otra de las limitaciones que contemplamos incluye la heterogeneidad del propio LARC (586–588).

Sin embargo, consideramos que la ausencia de validación no compromete los resultados de la cohorte de exploración, ya que, precisamente en esta cohorte, existe concordancia y plausibilidad biológica entre la sobreexpresión de estos genes, sobre todo EDEM3, y el mal pronóstico, lo que en nuestra opinión justifica continuar investigando el papel de estos genes en el contexto del LARC. Para ello, sería necesario analizar su expresión en cohortes de pacientes más numerosas y en estudios multicéntricos que permitan determinar la prevalencia de EDEM3 y su potencial como biomarcador.

En este trabajo determinamos la sobreexpresión de EDEM3 y LINC01433 mediante protocolos de Illumina (589), la plataforma de NGS (*Next-Generation Sequencing*) de la que disponía nuestro centro de investigación. Existen otras plataformas de NGS con distinta profundidad de análisis (590) pero el hecho de realizar el análisis de la cohorte de exploración (en el año 2014) y de la de validación (en 2017) con la misma plataforma confiere a nuestro trabajo coherencia interna.

### **5.3. Discusión de la fase de análisis**

#### **5.3.1. Biomarcadores pronósticos**

En nuestro estudio hemos demostrado el papel pronóstico negativo en supervivencia libre de recaída y supervivencia global a cinco años de los siguientes factores:

##### **5.3.1.1. Mutaciones en KRAS**

Las mutaciones de KRAS se asocian con un mal pronóstico en supervivencia libre de recaída y supervivencia global a 5 años. En nuestra muestra, las mutaciones de KRAS estaban presentes en el 24,7% de los pacientes, una frecuencia menor que la reportada en otras publicaciones (396,588,591,592) aunque similar a otras (593).

Sabemos que las mutaciones de KRAS se consideran un importante biomarcador pronóstico y predictivo para los pacientes con CCR (594), pero su papel en el contexto del LARC no ha sido bien determinado. Si bien algunos estudios contradicen nuestros resultados y no encuentran relación entre las mutaciones de KRAS en supervivencia libre de progresión o supervivencia global (592,400,595,398), nuestros resultados coinciden en la ausencia de relación con la respuesta a la QRT neoadyuvante ( $p = 0,164$ ), algo que también ha sido discutido en otros estudios con resultados contradictorios (397,394,395).

A pesar de la controversia actual, un reciente meta-análisis de 17 artículos y más de 3.600 pacientes (596) ha determinado que las mutaciones de KRAS en LARC se asocian significativamente con una peor supervivencia global pero sin influencia alguna en la respuesta al tratamiento neoadyuvante, por lo que consideramos nuestros resultados relevantes y plausibles a la luz de esta publicación.

##### **5.3.1.2. Grado de diferenciación**

El grado de diferenciación pobre (G3) ha demostrado ser un factor de mal pronóstico que implica un mayor riesgo de recaída y peor supervivencia tanto en CCR (597–599) como en LARC (383,600) y es un factor relevante a tener en cuenta a la hora de decidir la administración de quimioterapia adyuvante (302)

##### **5.3.1.3. Invasión venosa extramural (EMVI).**

La invasión venosa extramural determinada por el patólogo tras la cirugía (pEMVI), es un factor de mal pronóstico en supervivencia. Talbot, uno de los primeros patólogos que definió la invasión venosa, estimaba que la pEMVI confería un riesgo de hasta cuatro veces más de desarrollar metástasis hepáticas y una tasa de supervivencia a 5 años del

33% (601). Estudios posteriores han demostrado que la peMVI es un factor predictor independiente de mal pronóstico de recidiva local, metástasis ganglionares, metástasis sincrónicas y a distancia, y peor supervivencia (602–605). De acuerdo con la literatura revisada, nuestros resultados también están en línea con la evidencia publicada.

#### **5.3.1.4. Invasión linfovascular (LVI) y perineural (PNI)**

De acuerdo con los resultados de nuestro estudio, tanto la LVI como la PNI han sido considerados factores de mal pronóstico de recaída y supervivencia, algo descrito y bien documentado en la literatura (606,499,607,608). Sin embargo, otros estudios solo han evidenciado el impacto pronóstico y peor supervivencia para la PNI y no para la LVI, sugiriendo incluso que podría ser un criterio para identificar pacientes que pudieran beneficiarse del tratamiento adyuvante de quimioterapia (609,610).

#### **5.3.1.5. Afectación ganglionar tras la cirugía (ypN+)**

La presencia de infiltración ganglionar tras la cirugía es uno de los factores de mal pronóstico más importantes en cáncer colorrectal y se correlaciona con un mayor riesgo de recaída y menor supervivencia (206,611,612). No obstante, algunos estudios recientes han comunicado resultados contradictorios, donde parece que aquellos pacientes que presentan respuesta completa ganglionar (ypN0) y signos de respuesta al tratamiento (fibrosis, necrosis o presencia de mucina sin celularidad residual viable) presentan un mayor riesgo de recurrencia frente a aquellos con ypN+, aunque sin diferencias en supervivencia global (613).

En el contexto del LARC tratado con QRT neoadyuvante existe una dificultad adicional, que es la de identificar un número mínimo de ganglios linfáticos necesario para garantizar la calidad de la cirugía. Aunque las guías de la AJCC recomiendan un mínimo de 12 ganglios para considerar adecuada la cirugía (614), numerosos autores han reportado la dificultad de alcanzar esta cifra ya que la QRT neoadyuvante disminuye el promedio de ganglios resecados (615–617). Algunos autores han determinado hasta en 4 ganglios linfáticos menos de promedio (618) y otros han propuesto bajar el límite hasta los 7-10 ganglios resecados (619,620) ya que no hay evidencias de que menos ganglios influyan en la supervivencia (621–624).

En nuestra serie, la media de ganglios linfáticos resecados fue 9,2 (0 – 32) y la media de ganglios linfáticos positivos de 1,3 (0 – 29), por lo que consideramos que, basándonos en la evidencia disponible, el tratamiento quirúrgico realizado fue de la suficiente calidad y de acuerdo a los estándares y publicaciones.

#### **5.3.1.6. Niveles de hemoglobina tras la QRT (Hb2) y la cirugía (Hb3)**

El papel de los niveles de hemoglobina antes y durante el tratamiento preoperatorio de QRT en LARC ha sido evaluado en algunos estudios que han identificado la anemia como un factor pronóstico adverso asociado a un peor control local, mayor riesgo de recaída y peor supervivencia en comparación con aquellos pacientes sin anemia (625–627) considerando un punto de corte de 12 g/dL.

En nuestra serie observamos cómo el grupo recaída presenta a lo largo de todo el proceso niveles de hemoglobina más bajos que el grupo no recaída, aunque no descienden por debajo del punto de corte de 12 g/dL hasta el análisis postoperatorio (donde ambos grupos lo hacen). Esta tendencia está en línea con lo publicado y, por tanto, creemos que está justificado considerar los niveles de hemoglobina durante el tratamiento (tras la QRT y tras la cirugía) como una variable pronóstica relevante cuyo punto de corte para los niveles de hemoglobina debe determinarse en función del momento temporal del análisis de la muestra.

#### **5.3.1.7. Ratios hematológicas**

Nuestro estudio confirma la capacidad pronóstica de recaída de las ratios LMR y PLR determinadas tras la QRT neoadyuvante (LMR2 y PLR2).

Según la bibliografía, una LMR elevada se ha identificado como un factor pronóstico para una supervivencia más prolongada en el CCR (362,363). Más concretamente, en el cáncer de recto se ha asociado un peor pronóstico con una menor LMR previa al tratamiento neoadyuvante (LMR1 según nuestro estudio) (377). Por otro lado, una ratio PLR elevada se considera un factor de mal pronóstico en CCR avanzado (628), y en LARC una ratio PLR elevada antes de la neoadyuvancia también confiere un mal pronóstico ya sea por sí sola (539) o combinada con la ratio NLR (370), aunque en otros estudios esta combinación (NLR y PLR) no lo ha demostrado (373).

La mayoría de estudios referenciados anteriormente basan sus resultados, como norma general, en la extracción inicial antes del tratamiento de QRT. En este sentido, uno de los aspectos novedosos de nuestro estudio es la monitorización de los cambios longitudinales en los recuentos hematológicos. Aunque existen estudios similares en CCR (629–632), no hemos encontrado este tipo de análisis en el contexto del LARC.

#### **5.3.1.8. Grado de regresión tumoral y supervivencia**

En cuanto al grado de regresión tumoral, muchos estudios lo consideran un marcador subrogado de supervivencia, asociando un mejor pronóstico a una mayor respuesta obtenida tras el tratamiento neoadyuvante (199,200,633–637).

Sin embargo, no hemos podido corroborar este aspecto en nuestro estudio, ya que no encontramos diferencias estadísticamente significativas ni en la SLP ni en la SG a 5 años entre los grupos estratificados según su TRG. Una de las posibles explicaciones es que esto puede deberse al sistema de calificación de regresión utilizado (sistema de Ryan modificado (207) en nuestro caso) ya que en la bibliografía mencionada anteriormente cada estudio utilizó un sistema de calificación diferente.

#### **5.3.1.9. Quimioterapia adyuvante y supervivencia**

El papel del beneficio de la QT adyuvante tras un tratamiento neoadyuvante de QRT y cirugía es uno de los aspectos más controvertidos y que a día de hoy todavía se encuentra en debate y consideración, ya que los resultados son contradictorios con estudios que demuestran su beneficio (638–640) y otros que no lo hacen (641,285,642,286,643).

En este trabajo se demuestra una correlación entre la administración de QT adyuvante y la supervivencia. Sin embargo, estos datos pueden estar sesgados por varios motivos. En primer lugar, por el bajo número de pacientes que no recibieron QT adyuvante (únicamente 11). En segundo lugar, porque puede tratarse de un grupo de pacientes de especial mal pronóstico que no recibieron tratamiento adyuvante por cursar con postoperatorios tórpidos o por intolerancia a la quimioterapia durante el tratamiento neoadyuvante. Finalmente, el estudio no estaba diseñado para demostrar diferencias respecto a esta variable. Por tanto, consideramos que no deben extraerse conclusiones definitivas sobre este hallazgo y considerarlo como algo anecdótico.

### **5.3.2. Consideraciones respecto al modelo pronóstico**

A partir de los datos obtenidos, hemos desarrollado un modelo pronóstico de recaída basado en cuatro variables; tres obtenidas tras la analítica extraída tras la QRT neoadyuvante (Hb2; LMR2; y PLR2) y una cuarta tras la cirugía (el número de ganglios linfáticos positivos).

Una de las ventajas de este modelo es la sencillez y la viabilidad de su utilización, ya que tres variables pueden obtenerse de manera rutinaria tras finalizar la QRT neoadyuvante, y la cuarta se obtiene tras la cirugía. Idealmente, este modelo podría ser una herramienta de utilidad para determinar la conveniencia o no de administrar tratamiento adyuvante tras la cirugía en función de estas variables.

Entre las fortalezas de este modelo destacan que se ha obtenido de una cohorte de población en nuestro medio y tratada por los mismos equipos de oncología médica, radioterapia y cirugía, lo que en nuestra opinión disminuye los sesgos y refuerza la validez interna de nuestros resultados. Se trata también de un modelo novedoso, que introduce una serie de variables hematológicas para ponderar el riesgo de recaída a considerar junto con el resto de factores de riesgo ya conocidos. Por último, es un estudio consistente con una mediana de seguimiento muy prolongada (7,4 años) y poco frecuente para este tipo de estudios prospectivos.

Entre las limitaciones podemos destacar la falta de validez externa, ya que sería necesario validar la utilidad y reproducibilidad de este modelo en otras poblaciones. Sin embargo, desde nuestro punto de vista la limitación más importante de este modelo es la ausencia de ponderación de cada variable por separado y su utilidad práctica en individuos que presenten únicamente una, dos o tres de estas variables, que por otra parte probablemente supongan el grupo más numeroso de pacientes. Por último, otra de las críticas de este modelo es que otros factores pronósticos histopatológicos como la EMVI o la invasión perineural, son tan relevantes que por sí mismos pueden justificar la administración de tratamiento adyuvante sin necesidad de utilizar este modelo.

### **5.3.3. Biomarcadores predictivos**

En cuanto a la búsqueda de potenciales biomarcadores predictivos de respuesta a la QRT medido en función del GRT, nuestro estudio ha demostrado que la determinación previa al inicio de la neoadyuvancia de la bilirrubina y los marcadores tumorales CEA y CA19.9 presentaban diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de buena respuesta (GRT 0-1) y escasa respuesta (GRT 2-3). En la publicación previa (533), únicamente la bilirrubina demostró diferencias.

#### **5.3.3.1. Bilirrubina**

En la literatura, los niveles elevados de bilirrubina se han correlacionado con un mayor riesgo de afectación de los ganglios linfáticos después de la cirugía (644,645) aunque el nivel de corte propuesto (2,6 mmol/L = 0,15 mg/dL) fue bastante superior al punto de corte calculado por el índice de Youden (0,6mg/dL) en nuestro estudio y por lo tanto no parece ser comparable.

#### **5.3.4. Consideraciones respecto al modelo predictivo**

Al igual que el modelo pronóstico, este modelo predictivo es sencillo y muy práctico, ya que puede evaluarse en la primera determinación analítica con un parámetro que se solicita de manera rutinaria. Al igual que en el modelo pronóstico, habría que añadirle las ventajas de la validez interna y de ser datos propios de nuestro centro.

Entre las limitaciones ya conocidas de la falta de validez externa hay que destacar que el punto de corte de la bilirrubina se encuentra dentro del rango de normalidad de nuestro laboratorio (0 – 1,2 mg/dL), y es un parámetro que puede oscilar y elevarse por múltiples causas no relacionadas con el LARC lo que en nuestra opinión dificulta su implementación y cuestiona la plausibilidad biológica de la capacidad predictiva de esta variable. Por último, cabe preguntarse acerca de la utilidad de un modelo predictivo de respuesta, cuando en nuestro estudio hemos demostrado que el grado de respuesta no es un marcador subrogado de supervivencia.

#### **5.4. Corolario**

Como conclusión, a pesar de la sencillez de los modelos pronóstico y predictivo y su bondad desde el punto de vista estadístico, no podemos concluir que sean clínicamente relevantes o que vayan a cambiar la práctica clínica diaria. Sin embargo, nuestros resultados están en línea con la evidencia científica publicada hasta el momento actual y, en nuestra opinión, generan nuevas hipótesis a explorar tanto en lo referente al papel de los parámetros analíticos (sobre todo la hemoglobina) y a los cambios longitudinales hematológicos en función del momento terapéutico. Así mismo, sugieren la necesidad de explorar con más profundidad el papel de EDEM3 y LINC01433 en el cáncer de recto.

## **6. CONCLUSIONES**

---



## 6. Conclusiones

1. Hemos conseguido identificar en una cohorte de pacientes con LARC tratados con QRT neoadyuvante, mediante técnicas de ultrasecuenciación masiva, la sobreexpresión de dos genes (EDEM3 y LNC01433) capaces de discriminar a los pacientes que recaen frente a los que no lo hacen.
2. Se han construido vectores para la sobreexpresión y el silenciamiento de los genes EDEM3 y LINC01433 mediante la tecnología CRISPR/Cas9 y se ha demostrado su utilidad para modular la expresión de dichos genes en células de cáncer de colon.
3. La sobreexpresión de EDEM3 no tuvo efectos sobre la proliferación y migración de las células HCT116, pero su silenciamiento redujo la capacidad proliferativa y migratoria de estas. La sobreexpresión del LncRNA LINC01433 aumentó los niveles de proliferación y migración de las células HCT116. Estos resultados sugieren que ambos genes tienen actividad pro-tumoral y pro-metastásica.
4. En la cohorte de validación, no hemos conseguido demostrar la sobreexpresión de EDEM3 y de LINC01433 debido a la heterogeneidad tumoral y a las diferencias significativas entre las cohortes estudiadas.
5. En el análisis univariante de los factores pronósticos de supervivencia, hemos demostrado que las mutaciones en KRAS se asocian de manera estadísticamente significativa con un mal pronóstico en supervivencia libre de recaída y supervivencia global a 5 años sin influencia en la respuesta al tratamiento neoadyuvante de QRT.

6. Además de las mutaciones en KRAS, hemos determinado el valor pronóstico adverso en supervivencia libre de recaída y supervivencia global a cinco años de los siguientes factores: invasión vascular extramural (EMVI), invasión linfovascular, grado histológico pobremente diferenciado (G3), niveles de Hb tras la QRT (Hb2) menores de 12,3ng/mL; Niveles de hemoglobina tras la cirugía (Hb3) menores de 11,45g/dL; ratios linfocito/monocito y plaquetas/linfocitos tras la QRT (LMR2 y PLR2) menores de 1,26 y mayores de 229,5 respectivamente y afectación ganglionar tras la cirugía (ypN+).
  
7. Hemos demostrado que ni el grado de regresión tumoral (GRT) ni la respuesta completa patológica (GRT 0) son marcadores subrogados de supervivencia libre de recaída ni de supervivencia global.
  
8. Proponemos un modelo pronóstico basado en tres variables obtenidas tras la QRT y una tras la cirugía: 1) los niveles de hemoglobina (Hb2); 2) la ratio LMR; 3) la ratio PLR2 y 4) el número de ganglios linfáticos positivos, con una capacidad discriminadora desde el punto vista estadístico excelente (AUC = 0,84; IC del 95 %: 0,74–0,94;  $p < 0,001$ ).
  
9. Proponemos un modelo predictivo de respuesta a la QRT de acuerdo al grado de regresión tumoral basado en los niveles de bilirrubina. El modelo demuestra también una capacidad discriminadora aceptable (AUC = 0,75; 95% CI 0.62 – 0,88;  $p = 0,001$ ).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---



## 7. Bibliografía

1. Martín Carnicero A, López López C, Rivera Herrero F. Tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado. FMC Oncol. junio de 2010;5(14):101-8.
2. Cancer today [Internet]. [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
3. 10\_8\_9-Colorectum-fact-sheet.pdf [Internet]. [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: [https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10\\_8\\_9-Colorectum-fact-sheet.pdf](https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf)
4. 9-Rectum-fact-sheet.pdf [Internet]. [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/9-Rectum-fact-sheet.pdf>
5. 2022 - Estimación de la incidencia de cáncer en España.pdf [Internet]. [citado 21 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://redcan.org/storage/documents/6c2d9c1d-dfe9-40ea-a8b3-a343c4886131.pdf>
6. Miller KD, Nogueira L, Devasia T, Mariotto AB, Yabroff KR, Jemal A, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. CA Cancer J Clin. 23 de junio de 2022;
7. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex. julio de 2017;19(7):799-825.
8. Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. WHO [Internet]. [citado 19 de julio de 2021]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
9. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Rosso T, Boffetta P, Levi F, et al. European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. abril de 2016;27(4):725-31.
10. Ait Ouakrim D, Pizot C, Boniol M, Malvezzi M, Boniol M, Negri E, et al. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. BMJ. 6 de octubre de 2015;351:h4970.
11. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER) [Internet]. National Cancer Institute; Disponible en: <https://seer.cancer.gov/>
12. EUROCARE: Survival of cancer patients in Europe. Istituto Nazionale Tumori (Milan, Italy) and Istituto Superiore di Sanità (Rome, Italy);

13. ECIS - European Cancer Information System [Internet]. Disponible en: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>
14. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* agosto de 2008;9(8):730-56.
15. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCORE-5-a population-based study. *Lancet Oncol.* enero de 2014;15(1):23-34.
16. Holleczeck B, Rossi S, Domenic A, Innos K, Minicozzi P, Francisci S, et al. On-going improvement and persistent differences in the survival for patients with colon and rectum cancer across Europe 1999-2007 - Results from the EUROCORE-5 study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. octubre de 2015;51(15):2158-68.
17. Lepage C, Bossard N, Dejardin O, Carmona-Garcia MC, Manfredi S, Faivre J, et al. Trends in net survival from rectal cancer in six European Latin countries: results from the SUDCAN population-based study. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP.* enero de 2017;26 Trends in cancer net survival in six European Latin Countries: the SUDCAN study:S48-55.
18. Perucha J. Registro de Cáncer de La Rioja. 2017.
19. Servidor Interactivo de Información Epidemiológica (ARIADNA). Instituto de Salud Carlos III [Internet]. Disponible en: <http://ariadna.cne.isciii.es/>
20. Sadler T. Langman. *Embriología Médica*. 13th ed. Wolters Kluwer.; 2016. 426 p.
21. Carlson E. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 5th ed. España: Elsevier; 2014. 521 p.
22. Dicciomed. Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico. [Internet]. Dicciomed. [citado 20 de julio de 2021]. Disponible en: <https://dicciomed.usal.es/palabra/recto>
23. Mitidieri V. Anatomía quirúrgica rectoanal [Internet]. Sociedad Argentina de Cirugía Digestiva. 2014. Disponible en: <https://sacd.org.ar/wp-content/uploads/2020/05/360rectoanal-texto-endise%C3%B1o.pdf>
24. Wineski LE, Snell. *Anatomía Clínica por regiones*. 10th ed. Wolters Kluwer; 2019. 1471 p.
25. Moszkowicz D, Fuks D, Gayet B. Surgical Anatomy of the Rectum. En: *Surgical Techniques in Rectal Cancer Transanal, Laparoscopic and Robotic Approach*. Giovanni Dapri, John Marks. Springer Japan; 2018. p. 133.

26. Salerno G, Sinnatamby C, Branagan G, Daniels IR, Heald RJ, Moran BJ. Defining the rectum: surgically, radiologically and anatomically. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* septiembre de 2006;8 Suppl 3:5-9.
27. Heald RJ, Moran BJ. Embryology and anatomy of the rectum. *Semin Surg Oncol.* septiembre de 1998;15(2):66-71.
28. Jorge JM, Wexner SD. Anatomy and physiology of the rectum and anus. *Eur J Surg Acta Chir.* octubre de 1997;163(10):723-31.
29. Division of the upper, middle, and lower rectum - UpToDate [Internet]. [citado 16 de septiembre de 2022]. Disponible en: [https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=SURG%2F107991&topicKey=SURG%2F17127&search=rectum%20anatomy&source=outline\\_link&selectedTitle=1~150](https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=SURG%2F107991&topicKey=SURG%2F17127&search=rectum%20anatomy&source=outline_link&selectedTitle=1~150)
30. Chapuis P, Bokey L, Fahrner M, Sinclair G, Bogduk N. Mobilization of the rectum: anatomic concepts and the bookshelf revisited. *Dis Colon Rectum.* enero de 2002;45(1):1-8; discussion 8-9.
31. Bertrand MM, Colombo PE, Prudhomme M, Rouanet P. Cáncer de recto: anatomía quirúrgica. *EMC - Téc Quirúrgicas - Apar Dig.* 1 de abril de 2016;32(2):1-9.
32. Morgado PJ. Total mesorectal excision: a misnomer for a sound surgical approach. *Dis Colon Rectum.* enero de 1998;41(1):120-1.
33. El mesenterio: estructura, función y mesenteriopatías [Internet]. [citado 7 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenidoover.asp?contenido=90396>
34. Maunsell HW. A new method of excising the two upper portions of the rectum and the lower segment of the sigmoid flexure of the colon. *The Lancet.* 27 de agosto de 1892;140(3600):473-6.
35. Heald RJ, Moran BJ, Ryall RD, Sexton R, MacFarlane JK. Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997. *Arch Surg Chic Ill 1960.* agosto de 1998;133(8):894-9.
36. Heald RJ. A new approach to rectal cancer. *Br J Hosp Med.* septiembre de 1979;22(3):277-81.
37. Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg.* octubre de 1982;69(10):613-6.
38. Lee JM, Kim NK. Essential Anatomy of the Anorectum for Colorectal Surgeons Focused on the Gross Anatomy and Histologic Findings. *Ann Coloproctology.* abril de 2018;34(2):59-71.

39. Jonnesco T, Charpy A, Poirier P. Appareil Digestif. En: Traite´ d'anatomie humaine Volume IV. 2nd ed. Masson et Cie; 1901. p. 372-3.
40. Carmichael JC, Mills S. Anatomy and Embryology of the Colon, Rectum, and Anus. En: Steele SR, Hull TL, Read TE, Saclarides TJ, Senagore AJ, Whitlow CB, editores. The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 21 de julio de 2021]. p. 3-26. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25970-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25970-3_1)
41. Sato K, Sato T. The vascular and neuronal composition of the lateral ligament of the rectum and the rectosacral fascia. *Surg Radiol Anat SRA*. 1991;13(1):17-22.
42. Crapp AR, Cuthbertson AM. William Waldeyer and the rectosacral fascia. *Surg Gynecol Obstet*. febrero de 1974;138(2):252-6.
43. Church JM, Raudkivi PJ, Hill GL. The surgical anatomy of the rectum--a review with particular relevance to the hazards of rectal mobilisation. *Int J Colorectal Dis*. agosto de 1987;2(3):158-66.
44. Alessa MY. Understanding the Anatomy of the Denonvilliers Fascia: Review Article. *J Coloproctology*. junio de 2021;41(2):193-7.
45. Denonvilliers CP. Anatomie du perinée. *Bull Soc Anat Paris*. 1836;(11):105-7.
46. Lindsey I, Warren BF, Mortensen NJ. Denonvilliers' fascia lies anterior to the fascia propria and rectal dissection plane in total mesorectal excision. *Dis Colon Rectum*. enero de 2005;48(1):37-42.
47. Lindsey I, Guy RJ, Warren BF, Mortensen NJ. Anatomy of Denonvilliers' fascia and pelvic nerves, impotence, and implications for the colorectal surgeon. *Br J Surg*. octubre de 2000;87(10):1288-99.
48. Stoker J. Anorectal and pelvic floor anatomy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2009;23(4):463-75.
49. Fotton B, Cayrac M, Letouzey V, Masia F, Mousty E, Marès P, et al. Anatomía funcional del piso pélvico. *EMC - Ginecol-Obstet*. 1 de marzo de 2015;51(1):1-20.
50. Netter FH. Atlas de Anatomía Humana. 7th ed. Elsevier; 2019. 1160 p.
51. Anorectal disorders [Internet]. Basic medical Key. Fastest Basic medical Insight Engine. Disponible en: <https://basicmedicalkey.com/anorectal-disorders-2/>

52. Mahadevan V. Anatomy of the rectum and anal canal. *Surg Oxf.* 1 de marzo de 2017;35(3):121-5.
53. Bell S, Sasaki J, Sinclair G, Chapuis PH, Bokey EL. Understanding the anatomy of lymphatic drainage and the use of blue-dye mapping to determine the extent of lymphadenectomy in rectal cancer surgery: unresolved issues. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* junio de 2009;11(5):443-9.
54. Szmulowicz UM, Wu JS. Squamous cell carcinoma of the anal canal: a review of the aetiology, presentation, staging, prognosis and methods available for treatment. *Sex Health.* diciembre de 2012;9(6):593-609.
55. Kwaan M, Zbar AP, editores. *Comprehensive Rectal Cancer Care* [Internet]. Springer International Publishing; 2019 [citado 21 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.springer.com/gp/book/9783319989013>
56. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1 de septiembre de 1988;319(9):525-32.
57. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1 de junio de 1990;61(5):759-67.
58. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 29 de marzo de 2013;339(6127):1546-58.
59. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 18 de julio de 2012;487(7407):330-7.
60. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479-507.
61. Brown MA, Ried T. Shifting the Focus of Signaling Abnormalities in Colon Cancer. *Cancers.* 3 de febrero de 2022;14(3):784.
62. Weinberg RA. *The biology of Cancer.* 2nd ed. W.W Norton & Company; 2013. 876 p.
63. Wong YH, Pellicer A, Liu W. RAS Genes. En: Schwab M, editor. *Encyclopedia of Cancer* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2017 [citado 29 de agosto de 2022]. p. 3917-22. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-46875-3\\_4951](https://doi.org/10.1007/978-3-662-46875-3_4951)
64. Ryan MB, Corcoran RB. Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nat Rev Clin Oncol.* noviembre de 2018;15(11):709-20.

65. Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, Siena S, Zhang K, Williams R, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de febrero de 2013;31(6):759-65.
66. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. agosto de 2010;11(8):753-62.
67. Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. julio de 2018;8(4):552-62.
68. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol*. septiembre de 2012;107(9):1315-29; quiz 1314, 1330.
69. Sansregret L, Vanhaesebroeck B, Swanton C. Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. marzo de 2018;15(3):139-50.
70. Gallois C, Laurent-Puig P, Taieb J. Methylator phenotype in colorectal cancer: A prognostic factor or not? *Crit Rev Oncol Hematol*. marzo de 2016;99:74-80.
71. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol*. diciembre de 1999;9(12):M57-60.
72. Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. julio de 2011;94(2):166-200.
73. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. marzo de 2010;7(3):153-62.
74. Kloor M, von Knebel Doeberitz M. The Immune Biology of Microsatellite-Unstable Cancer. *Trends Cancer*. marzo de 2016;2(3):121-33.
75. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. junio de 2019;16(6):361-75.
76. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol*. octubre de 2015;47(4):1189-202.
77. Tafe LJ, Riggs ER, Tsongalis GJ. Lynch syndrome presenting as endometrial cancer. *Clin Chem*. enero de 2014;60(1):111-21.

78. Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):199-206.
79. Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int*. 2020;20:16.
80. Monument MJ, Lessnick SL, Schiffman JD, Randall RT. Microsatellite instability in sarcoma: fact or fiction? *ISRN Oncol*. 2012;2012:473146.
81. Fassan M, Scarpa A, Remo A, De Maglio G, Troncone G, Marchetti A, et al. Current prognostic and predictive biomarkers for gastrointestinal tumors in clinical practice. *Pathologica*. septiembre de 2020;112(3):248-59.
82. Guillén-Ponce C, Serrano R, Sánchez-Heras AB, Teulé A, Chirivella I, Martín T, et al. Clinical guideline seom: hereditary colorectal cancer. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. diciembre de 2015;17(12):962-71.
83. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. junio de 2010;138(6):2073-2087.e3.
84. Guillén-Ponce C, Lastra E, Lorenzo-Lorenzo I, Martín Gómez T, Morales Chamorro R, Sánchez-Heras AB, et al. SEOM clinical guideline on hereditary colorectal cancer (2019). *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. febrero de 2020;22(2):201-12.
85. Julsing JR, Peters GJ. Methylation of DNA repair genes and the efficacy of DNA targeted anticancer treatment. *Oncol Discov*. 16 de octubre de 2014;2(1):3.
86. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn JMD*. enero de 2008;10(1):13-27.
87. Juo YY, Johnston FM, Zhang DY, Juo HH, Wang H, Pappou EP, et al. Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. diciembre de 2014;25(12):2314-27.
88. Kim JH, Shin SH, Kwon HJ, Cho NY, Kang GH. Prognostic implications of CpG island hypermethylator phenotype in colorectal cancers. *Virchows Arch Int J Pathol*. diciembre de 2009;455(6):485-94.
89. De Palma FDE, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers*. 20 de julio de 2019;11(7):E1017.

90. Board WC of TE. Digestive System Tumours [Internet]. [citado 25 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Digestive-System-Tumours-2019>
91. Mezzapesa M, Losurdo G, Celiberto F, Rizzi S, d'Amati A, Piscitelli D, et al. Serrated Colorectal Lesions: An Up-to-Date Review from Histological Pattern to Molecular Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 18 de abril de 2022;23(8):4461.
92. Roepman P, Schlicker A, Taberero J, Majewski I, Tian S, Moreno V, et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Cancer*. 1 de febrero de 2014;134(3):552-62.
93. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. noviembre de 2015;21(11):1350-6.
94. Lee GH, Malietzis G, Askari A, Bernardo D, Al-Hassi HO, Clark SK. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? - a systematic review. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. marzo de 2015;41(3):300-8.
95. Yang SY, Cho MS, Kim NK. Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Rev Anticancer Ther*. abril de 2018;18(4):351-8.
96. Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC, et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer*. 20 de enero de 2004;108(3):433-42.
97. Valle L, Vilar E, Tavtigian SV, Stoffel EM. Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J Pathol*. abril de 2019;247(5):574-88.
98. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de abril de 2017;35(10):1086-95.
99. Medina Pabón MA, Babiker HM. A Review Of Hereditary Colorectal Cancers. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 23 de agosto de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538195/>
100. Stoffel EM, Boland CR. Genetics and Genetic Testing in Hereditary Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. octubre de 2015;149(5):1191-1203.e2.
101. Kim JC, Bodmer WF. Genotypic and Phenotypic Characteristics of Hereditary Colorectal Cancer. *Ann Coloproctology*. diciembre de 2021;37(6):368-81.

102. Bond CE, Whitehall VLJ. How the BRAF V600E Mutation Defines a Distinct Subgroup of Colorectal Cancer: Molecular and Clinical Implications. *Gastroenterol Res Pract*. 2018;2018:9250757.
103. Schierbeck J, Vestergaard T, Bygum A. Skin Cancer Associated Genodermatoses: A Literature Review. *Acta Derm Venereol*. 1 de abril de 2019;99(4):360-9.
104. John AM, Schwartz RA. Muir-Torre syndrome (MTS): An update and approach to diagnosis and management. *J Am Acad Dermatol*. marzo de 2016;74(3):558-66.
105. Shuen AY, Lanni S, Panigrahi GB, Edwards M, Yu L, Campbell BB, et al. Functional Repair Assay for the Diagnosis of Constitutional Mismatch Repair Deficiency From Non-Neoplastic Tissue. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de febrero de 2019;37(6):461-70.
106. Bakry D, Aronson M, Durno C, Rimawi H, Farah R, Alharbi QK, et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. marzo de 2014;50(5):987-96.
107. Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Geurts van Kessel A, Hoogerbrugge N. EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. *Fam Cancer*. junio de 2013;12(2):169-74.
108. Pathak SJ, Mueller JL, Okamoto K, Das B, Hertecant J, Greenhalgh L, et al. EPCAM mutation update: Variants associated with congenital tufting enteropathy and Lynch syndrome. *Hum Mutat*. febrero de 2019;40(2):142-61.
109. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study - PubMed [Internet]. [citado 23 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21145788/>
110. Amsterdam Criteria - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citado 24 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/amsterdam-criteria>
111. Nejadtoghi M, Jafari H, Farrokhi E, Samani KG. Familial Colorectal Cancer Type X (FCCTX) and the correlation with various genes-A systematic review. *Curr Probl Cancer*. diciembre de 2017;41(6):388-97.
112. Choi YH, Lakhal-Chaieb L, Kröl A, Yu B, Buchanan D, Ahnen D, et al. Risks of Colorectal Cancer and Cancer-Related Mortality in Familial Colorectal Cancer Type X and Lynch Syndrome Families. *J Natl Cancer Inst*. 1 de julio de 2019;111(7):675-83.

113. Therkildsen C, Rasmussen M, Smith-Hansen L, Kallemose T, Lindberg LJ, Nilbert M. Broadening risk profile in familial colorectal cancer type X; increased risk for five cancer types in the national Danish cohort. *BMC Cancer*. 22 de abril de 2020;20(1):345.
114. Win AK, Dowty JG, Cleary SP, Kim H, Buchanan DD, Young JP, et al. Risk of colorectal cancer for carriers of mutations in MUTYH, with and without a family history of cancer. *Gastroenterology*. mayo de 2014;146(5):1208-1211.e1-5.
115. Sereno M, Merino M, López-Gómez M, Gómez-Raposo C, Zambrana Tébar F, Moreno Rubio J, et al. MYH polyposis syndrome: clinical findings, genetics issues and management. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. agosto de 2014;16(8):675-9.
116. Mur P, García-Mulero S, Del Valle J, Magraner-Pardo L, Vidal A, Pineda M, et al. Role of POLE and POLD1 in familial cancer. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. diciembre de 2020;22(12):2089-100.
117. Palles C, Martin L, Domingo E, Chegwidden L, McGuire J, Cuthill V, et al. The clinical features of polymerase proof-reading associated polyposis (PPAP) and recommendations for patient management. *Fam Cancer*. abril de 2022;21(2):197-209.
118. Yan HHN, Lai JCW, Ho SL, Leung WK, Law WL, Lee JFY, et al. RNF43 germline and somatic mutation in serrated neoplasia pathway and its association with BRAF mutation. *Gut*. septiembre de 2017;66(9):1645-56.
119. Tacheci I, Kopacova M, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome. *Curr Opin Gastroenterol*. 1 de mayo de 2021;37(3):245-54.
120. Chow E, Macrae F. A review of juvenile polyposis syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*. noviembre de 2005;20(11):1634-40.
121. Hendricks LAJ, Hoogerbrugge N, Schuurs-Hoeijmakers JHM, Vos JR. A review on age-related cancer risks in PTEN hamartoma tumor syndrome. *Clin Genet*. febrero de 2021;99(2):219-25.
122. Jaeger E, Leedham S, Lewis A, Segditsas S, Becker M, Cuadrado PR, et al. Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat Genet*. 6 de mayo de 2012;44(6):699-703.
123. Davis H, Irshad S, Bansal M, Rafferty H, Boitsova T, Bardella C, et al. Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat Med*. enero de 2015;21(1):62-70.

124. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med.* 5 de marzo de 1992;326(10):658-62.
125. Tuohy TMF, Rowe KG, Mineau GP, Pimentel R, Burt RW, Samadder NJ. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. *Cancer.* 1 de enero de 2014;120(1):35-42.
126. Akimoto N, Ugai T, Zhong R, Hamada T, Fujiyoshi K, Giannakis M, et al. Rising incidence of early-onset colorectal cancer - a call to action. *Nat Rev Clin Oncol.* abril de 2021;18(4):230-43.
127. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* junio de 2012;10(6):639-45.
128. Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med.* 1 de noviembre de 1990;323(18):1228-33.
129. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors - UpToDate [Internet]. [citado 2 de septiembre de 2022]. Disponible en: [https://www.uptodate-com.lo-hsp.a17.csinet.es/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors?search=colorectal%20cancer%20risk%20factors&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate-com.lo-hsp.a17.csinet.es/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors?search=colorectal%20cancer%20risk%20factors&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
130. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut.* noviembre de 1994;35(11):1590-2.
131. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology.* febrero de 2008;134(2):388-95.
132. Figueiredo JC, Crockett SD, Snover DC, Morris CB, McKeown-Eyssen G, Sandler RS, et al. Smoking-associated risks of conventional adenomas and serrated polyps in the colorectum. *Cancer Causes Control CCC.* marzo de 2015;26(3):377-86.
133. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA.* 17 de diciembre de 2008;300(23):2765-78.
134. Winkels RM, Botma A, Van Duijnhoven FJB, Nagengast FM, Kleibeuker JH, Vasen HFA, et al. Smoking increases the risk for colorectal adenomas in patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology.* febrero de 2012;142(2):241-7.

135. Tsoi KKF, Pau CYY, Wu WKK, Chan FKL, Griffiths S, Sung JJY. Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* junio de 2009;7(6):682-688.e1-5.
136. Moskal A, Norat T, Ferrari P, Riboli E. Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. *Int J Cancer.* 1 de febrero de 2007;120(3):664-71.
137. Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 1 de noviembre de 2007;121(9):2065-72.
138. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut.* junio de 2013;62(6):933-47.
139. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 1 de junio de 2015;181(11):832-45.
140. Renehan AG, Soerjomataram I, Tyson M, Egger M, Zwahlen M, Coebergh JW, et al. Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. *Int J Cancer.* 1 de febrero de 2010;126(3):692-702.
141. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med.* 25 de agosto de 2016;375(8):794-8.
142. Suh S, Kim KW. Diabetes and cancer: is diabetes causally related to cancer? *Diabetes Metab J.* junio de 2011;35(3):193-8.
143. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA, Tei Y, Buffler PA. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am J Gastroenterol.* noviembre de 2011;106(11):1911-21; quiz 1922.
144. De Bruijn KMJ, Arends LR, Hansen BE, Leeflang S, Ruiters R, van Eijck CHJ. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. *Br J Surg.* octubre de 2013;100(11):1421-9.
145. Tsilidis KK, Kasimis JC, Lopez DS, Ntzani EE, Ioannidis JPA. Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMJ.* 2 de enero de 2015;350:g7607.
146. González N, Prieto I, Del Puerto-Nevado L, Portal-Nuñez S, Ardura JA, Corton M, et al. 2017 update on the relationship between diabetes and colorectal cancer: epidemiology,

- potential molecular mechanisms and therapeutic implications. *Oncotarget*. 14 de marzo de 2017;8(11):18456-85.
147. Mills KT, Bellows CF, Hoffman AE, Kelly TN, Gagliardi G. Diabetes mellitus and colorectal cancer prognosis: a meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. noviembre de 2013;56(11):1304-19.
148. Dehal AN, Newton CC, Jacobs EJ, Patel AV, Gapstur SM, Campbell PT. Impact of diabetes mellitus and insulin use on survival after colorectal cancer diagnosis: the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de enero de 2012;30(1):53-9.
149. Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2011;6(6):e20456.
150. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 12 de enero de 2005;293(2):172-82.
151. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, Ward MH, Park Y, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res*. 15 de marzo de 2010;70(6):2406-14.
152. Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, et al. Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis*. marzo de 1996;17(3):515-23.
153. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. enero de 2021;71(1):7-33.
154. Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N, Sung MK. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol*. 7 de mayo de 2015;21(17):5167-75.
155. Rombouts AJM, Huguenin N, Elferink MAG, Poortmans PMP, Nagtegaal ID, de Wilt JHW. Increased risk for second primary rectal cancer after pelvic radiation therapy. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. enero de 2020;124:142-51.
156. Nottage K, McFarlane J, Krasin MJ, Li C, Srivastava D, Robison LL, et al. Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 de julio de 2012;30(20):2552-8.
157. Yamada A, Komaki Y, Komaki F, Micic D, Zullo S, Sakuraba A. Risk of gastrointestinal cancers in patients with cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. junio de 2018;19(6):758-67.

158. Ochiai Y, Inoshita N, Iizuka T, Nishioka H, Yamada S, Kitagawa M, et al. Clinicopathological features of colorectal polyps and risk of colorectal cancer in acromegaly. *Eur J Endocrinol.* marzo de 2020;182(3):313-8.
159. Matano Y, Okada T, Suzuki A, Yoneda T, Takeda Y, Mabuchi H. Risk of colorectal neoplasm in patients with acromegaly and its relationship with serum growth hormone levels. *Am J Gastroenterol.* mayo de 2005;100(5):1154-60.
160. Kan M, Gill JS, Wiseman SM. Colon and rectal cancer after renal transplantation. *Expert Rev Anticancer Ther.* agosto de 2008;8(8):1339-46.
161. Kim M, Kim CW, Hwang S, Kim YH, Lee JL, Yoon YS, et al. Characteristics and Prognosis of Colorectal Cancer after Liver or Kidney Transplantation. *World J Surg.* octubre de 2021;45(10):3206-13.
162. Merchea A, Shahjehan F, Croome KP, Cochuyt JJ, Li Z, Colibaseanu DT, et al. Colorectal Cancer Characteristics and Outcomes after Solid Organ Transplantation. *J Oncol.* 2019;2019:5796108.
163. Gillissen S, Templeton A, Marra G, Kuo YF, Valtorta E, Shahinian VB. Risk of colorectal cancer in men on long-term androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1 de diciembre de 2010;102(23):1760-70.
164. Assayag J, Yin H, Benayoun S, Pollak MN, Suissa S, Azoulay L. Androgen deprivation therapy and the risk of colorectal cancer in patients with prostate cancer. *Cancer Causes Control CCC.* mayo de 2013;24(5):839-45.
165. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 17 de octubre de 2012;104(20):1548-61.
166. Harriss DJ, Atkinson G, Batterham A, George K, Cable NT, Reilly T, et al. Lifestyle factors and colorectal cancer risk (2): a systematic review and meta-analysis of associations with leisure-time physical activity. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* septiembre de 2009;11(7):689-701.
167. Friedenreich C, Norat T, Steindorf K, Boutron-Ruault MC, Pischon T, Mazuir M, et al. Physical activity and risk of colon and rectal cancers: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* diciembre de 2006;15(12):2398-407.

168. Asano TK, McLeod RS. Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and Aspirin for preventing colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(2):CD004079.
169. Gann PH, Manson JE, Glynn RJ, Buring JE, Hennekens CH. Low-dose aspirin and incidence of colorectal tumors in a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 4 de agosto de 1993;85(15):1220-4.
170. Rothwell PM, Fowkes FGR, Belch JFF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet Lond Engl.* 1 de enero de 2011;377(9759):31-41.
171. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet Lond Engl.* 20 de noviembre de 2010;376(9754):1741-50.
172. Burn J, Sheth H, Elliott F, Reed L, Macrae F, Mecklin JP, et al. Cancer prevention with aspirin in hereditary colorectal cancer (Lynch syndrome), 10-year follow-up and registry-based 20-year data in the CAPP2 study: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 13 de junio de 2020;395(10240):1855-63.
173. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD, Ma KN. Eating patterns and risk of colon cancer. *Am J Epidemiol.* 1 de julio de 1998;148(1):4-16.
174. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 4 de abril de 2001;93(7):525-33.
175. Koushik A, Hunter DJ, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Buring JE, et al. Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *J Natl Cancer Inst.* 3 de octubre de 2007;99(19):1471-83.
176. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet Lond Engl.* 3 de mayo de 2003;361(9368):1496-501.
177. Yao Y, Suo T, Andersson R, Cao Y, Wang C, Lu J, et al. Dietary fibre for the prevention of recurrent colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev.* 8 de enero de 2017;1:CD003430.

178. Shaukat A, Scouras N, Schünemann HJ. Role of supplemental calcium in the recurrence of colorectal adenomas: a metaanalysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol*. febrero de 2005;100(2):390-4.
179. Weingarten MA, Zalmanovici A, Yaphe J. Dietary calcium supplementation for preventing colorectal cancer and adenomatous polyps. *Cochrane Database Syst Rev*. 23 de enero de 2008;(1):CD003548.
180. Bond JH. Polyp guideline: diagnosis, treatment, and surveillance for patients with colorectal polyps. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol*. noviembre de 2000;95(11):3053-63.
181. Flood A, Peters U, Chatterjee N, Lacey JV, Schairer C, Schatzkin A. Calcium from diet and supplements is associated with reduced risk of colorectal cancer in a prospective cohort of women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. enero de 2005;14(1):126-32.
182. Aune D, Lau R, Chan DSM, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. enero de 2012;23(1):37-45.
183. Theodoratou E, Tzoulaki I, Zgaga L, Ioannidis JPA. Vitamin D and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. *BMJ*. 1 de abril de 2014;348:g2035.
184. McCullough ML, Zoltick ES, Weinstein SJ, Fedirko V, Wang M, Cook NR, et al. Circulating Vitamin D and Colorectal Cancer Risk: An International Pooling Project of 17 Cohorts. *J Natl Cancer Inst*. 1 de febrero de 2019;111(2):158-69.
185. Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S, et al. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 3 de enero de 2019;380(1):33-44.
186. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet Lond Engl*. 19 de octubre de 2019;394(10207):1467-80.
187. Thompson MR, O'Leary DP, Flashman K, Asimwe A, Ellis BG, Senapati A. Clinical assessment to determine the risk of bowel cancer using Symptoms, Age, Mass and Iron deficiency anaemia (SAMI). *Br J Surg*. septiembre de 2017;104(10):1393-404.
188. Ministerio de Sanidad - Profesionales - cribado poblacional - cribado cancer colorrectal [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2022]. Disponible en:

<https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/Cribado/CribadoCancerColorrectal.htm>

189. Alexander JC, Silverman NA, Chretien PB. Effect of age and cigarette smoking on carcinoembryonic antigen levels. *JAMA*. 3 de mayo de 1976;235(18):1975-9.
190. Konishi T, Shimada Y, Hsu M, Tufts L, Jimenez-Rodriguez R, Cercek A, et al. Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. *JAMA Oncol*. 1 de marzo de 2018;4(3):309-15.
191. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. septiembre de 2012;3(3):153-73.
192. File:Colorectal adenocarcinoma - alt -- intermed mag.jpg - Libre Pathology [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2022]. Disponible en: [https://librepathology.org/wiki/File:Colorectal\\_adenocarcinoma\\_-\\_alt\\_-\\_intermed\\_mag.jpg](https://librepathology.org/wiki/File:Colorectal_adenocarcinoma_-_alt_-_intermed_mag.jpg)
193. Garcia EG. Guía práctica sobre colonoscopia virtual. Seram [Internet]. 22 de noviembre de 2018 [citado 5 de septiembre de 2022]; Disponible en: <https://piper.espacio-seram.com/index.php/seram/article/view/92>
194. Adenocarcinoma de recto. Caso clínico - Página 3 de 4 - Revista Electrónica de Portales Medicos.com [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/adenocarcinoma-recto-caso-clinico/3/>
195. Horvat N, Carlos Tavares Rocha C, Clemente Oliveira B, Petkovska I, Gollub MJ. MRI of Rectal Cancer: Tumor Staging, Imaging Techniques, and Management. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc*. abril de 2019;39(2):367-87.
196. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 de octubre de 2018;29(Suppl 4):iv263.
197. AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. [citado 16 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/book/9783319406176>
198. Colorectal Cancer Stages | Rectal Cancer Staging | Colon Cancer Staging [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
199. Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de diciembre de 2005;23(34):8688-96.

200. Park IJ, You YN, Agarwal A, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Eng C, et al. Neoadjuvant treatment response as an early response indicator for patients with rectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de mayo de 2012;30(15):1770-6.
201. Fokas E, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Beissbarth T, Hess C, et al. Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de mayo de 2014;32(15):1554-62.
202. Fokas E, Ströbel P, Fietkau R, Ghadimi M, Liersch T, Grabenbauer GG, et al. Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy as a Prognostic Factor and Individual-Level Surrogate for Disease-Free Survival in Rectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1 de diciembre de 2017;109(12).
203. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 1997;12(1):19-23.
204. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer*. 1 de junio de 1994;73(11):2680-6.
205. Ryan R, Gibbons D, Hyland JMP, Treanor D, White A, Mulcahy HE, et al. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology*. agosto de 2005;47(2):141-6.
206. Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Saltz LB, et al. Pathologic stage is most prognostic of disease-free survival in locally advanced rectal cancer patients after preoperative chemoradiation. *Cancer*. 1 de julio de 2008;113(1):57-64.
207. Cancer Protocol Templates [Internet]. College of American Pathologists. [citado 6 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates>
208. Jäger T, Neureiter D, Urbas R, Klieser E, Hitzl W, Emmanuel K, et al. Applicability of American Joint Committee on Cancer and College of American Pathologists Regression Grading System in Rectal Cancer. *Dis Colon Rectum*. agosto de 2017;60(8):815-26.
209. Peng J, Lin J, Qiu M, Zhao Y, Deng Y, Shao J, et al. Oncogene mutation profile predicts tumor regression and survival in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy and radical surgery. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. julio de 2017;39(7):1010428317709638.

210. John arderne (1306(07)--1380(90)). JAMA. 1 de marzo de 1965; 191:756-7.
211. Viso L, Uriach J. The first twenty operations for rectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 1995;10(3):167-8.
212. Pring D, Freer G. History of a Case of the Successful Formation of an Artificial Anus in an Adult with an Account of an Analogous Operation in Two Cases. *Lond Med Phys J.* enero de 1821;45(263):1-15.
213. Classic articles in colonic and rectal surgery. Jean Zulema Amussat, 1796-1855. Notes on the possible establishment of an artificial anus in the lumbar region without entering the peritoneal cavity. *Dis Colon Rectum.* julio de 1983;26(7):483-7.
214. Menéndez P, Padilla D, Villarejo P, Menéndez JM, Rodríguez Montes JA, Martín J. [Historical aspects of neoplastic diseases: colorectal cancer]. *Gastroenterol Hepatol.* septiembre de 2010;33(7):541-6.
215. Classic articles in colonic and rectal surgery. Jacques Lisfranc 1790-1847. Observation on a cancerous condition of the rectum treated by excision. *Dis Colon Rectum.* octubre de 1983;26(10):694-5.
216. Guindic LC. Aspectos anecdóticos e históricos de las ileostomías y colostomías. *Rev Medica Hosp Gen Mex SS.* junio de 2006;69(2):113-8.
217. Graney MJ, Graney CM. Colorectal surgery from antiquity to the modern era. *Dis Colon Rectum.* septiembre de 1980;23(6):432-41.
218. Holmes T. A system of surgery, theoretical and practical. [Internet]. Vol. v.2. Philadelphia: H.C. Lea's son & co; 1881. 662 p. Disponible en: <https://archive.org/details/systemofsurgeryt002holm/page/662/mode/1up>
219. Perdawood SK. History of Rectal Cancer Surgery. En: Dapri G, Marks JH, editores. *Surgical Techniques in Rectal Cancer: Transanal, Laparoscopic and Robotic Approach* [Internet]. Tokyo: Springer Japan; 2018 [citado 25 de agosto de 2022]. p. 3-18. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55579-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55579-7_1)
220. Morgan CN. Carcinoma of the rectum. *Ann R Coll Surg Engl.* febrero de 1965;36:73-97.
221. William Ernest Miles (1869-1947) [Internet]. [citado 25 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.historiadelamedicina.org/milles.html>
222. Enker WE. The Natural History of Rectal Cancer 1908-2008: The Evolving Treatment of Rectal Cancer into the Twenty-First Century. *Semin Colon Rectal Surg.* 1 de junio de 2010;21(2):56-74.

223. Miles WE. A method of performing abdomino-perineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon (1908). *CA Cancer J Clin.* diciembre de 1971;21(6):361-4.
224. Mayo C. Cancer of the large bowel. *Med Sentin.* 1904;(12):466-73.
225. Lockhart-Mummery JP. Two hundred cases of cancer of the rectum treated by perineal excision. *BJS Br J Surg.* 1926;14(53):110-24.
226. Menéndez P, Padilla D, Villarejo P, Menéndez JM, Rodríguez Montes JA, Martín J. Aspectos históricos de las enfermedades neoplásicas: El cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol.* 1 de agosto de 2010;33(7):541-6.
227. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol.* 1932;35(3):323-32.
228. Dixon CF. Anterior Resection for Malignant Lesions of the Upper Part of the Rectum and Lower Part of the Sigmoid. *Ann Surg.* septiembre de 1948;128(3):425-42.
229. Goligher JC, Dukes CE, Bussey HJR. Local recurrences after sphincter saving excisions for carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Br J Surg.* noviembre de 1951;39(155):199-211.
230. Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. Histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet Lond Engl.* 1 de noviembre de 1986;2(8514):996-9.
231. Birbeck KF, Macklin CP, Tiffin NJ, Parsons W, Dixon MF, Mapstone NP, et al. Rates of circumferential resection margin involvement vary between surgeons and predict outcomes in rectal cancer surgery. *Ann Surg.* abril de 2002;235(4):449-57.
232. Ng IO, Luk IS, Yuen ST, Lau PW, Pritchett CJ, Ng M, et al. Surgical lateral clearance in resected rectal carcinomas. A multivariate analysis of clinicopathologic features. *Cancer.* 15 de marzo de 1993;71(6):1972-6.
233. Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet Lond Engl.* 28 de junio de 1986;1(8496):1479-82.
234. Enker WE. Potency, cure, and local control in the operative treatment of rectal cancer. *Arch Surg Chic Ill* 1960. diciembre de 1992;127(12):1396-401; discussion 1402.
235. Wibe A, Møller B, Norstein J, Carlsen E, Wiig JN, Heald RJ, et al. A national strategic change in treatment policy for rectal cancer--implementation of total mesorectal excision as routine treatment in Norway. A national audit. *Dis Colon Rectum.* julio de 2002;45(7):857-66.

236. Murty M, Enker WE, Martz J. Current status of total mesorectal excision and autonomic nerve preservation in rectal cancer. *Semin Surg Oncol.* diciembre de 2000;19(4):321-8.
237. Havenga K, Enker WE, Norstein J, Moriya Y, Heald RJ, van Houwelingen HC, et al. Improved survival and local control after total mesorectal excision or D3 lymphadenectomy in the treatment of primary rectal cancer: an international analysis of 1411 patients. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* agosto de 1999;25(4):368-74.
238. Plasencia G, Jacobs M, Verdeja JC, Viamonte M. Laparoscopic-assisted sigmoid colectomy and low anterior resection. *Dis Colon Rectum.* agosto de 1994;37(8):829-33.
239. Bonjer HJ, Deijen CL, Abis GA, Cuesta MA, van der Pas MHGM, de Lange-de Klerk ESM, et al. A randomized trial of laparoscopic versus open surgery for rectal cancer. *N Engl J Med.* 2 de abril de 2015;372(14):1324-32.
240. Fleshman J, Branda M, Sargent DJ, Boller AM, George V, Abbas M, et al. Effect of Laparoscopic-Assisted Resection vs Open Resection of Stage II or III Rectal Cancer on Pathologic Outcomes: The ACOSOG Z6051 Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 6 de octubre de 2015;314(13):1346-55.
241. Stevenson ARL, Solomon MJ, Lumley JW, Hewett P, Clouston AD, Gebiski VJ, et al. Effect of Laparoscopic-Assisted Resection vs Open Resection on Pathological Outcomes in Rectal Cancer: The ALaCaRT Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 6 de octubre de 2015;314(13):1356-63.
242. Martínez-Pérez A, Carra MC, Brunetti F, de'Angelis N. Pathologic Outcomes of Laparoscopic vs Open Mesorectal Excision for Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Surg.* 19 de abril de 2017;152(4):e165665.
243. Conticchio M, Papagni V, Notarnicola M, Delvecchio A, Riccelli U, Ammendola M, et al. Laparoscopic vs. open mesorectal excision for rectal cancer: Are these approaches still comparable? A systematic review and meta-analysis. *PloS One.* 2020;15(7):e0235887.
244. Vennix S, Pelzers L, Bouvy N, Beets GL, Pierie JP, Wiggers T, et al. Laparoscopic versus open total mesorectal excision for rectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 15 de abril de 2014;(4):CD005200.
245. Keller DS, Berho M, Perez RO, Wexner SD, Chand M. The multidisciplinary management of rectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* julio de 2020;17(7):414-29.
246. Trastulli S, Farinella E, Ciocchi R, Cavaliere D, Avenia N, Sciannameo F, et al. Robotic resection compared with laparoscopic rectal resection for cancer: systematic review and

- meta-analysis of short-term outcome. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* abril de 2012;14(4):e134-156.
247. Xiong B, Ma L, Zhang C, Cheng Y. Robotic versus laparoscopic total mesorectal excision for rectal cancer: a meta-analysis. *J Surg Res.* 15 de mayo de 2014;188(2):404-14.
248. Wang Y, Zhao GH, Yang H, Lin J. A Pooled Analysis of Robotic Versus Laparoscopic Surgery for Total Mesorectal Excision for Rectal Cancer. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* junio de 2016;26(3):259-64.
249. Li X, Wang T, Yao L, Hu L, Jin P, Guo T, et al. The safety and effectiveness of robot-assisted versus laparoscopic TME in patients with rectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *Medicine (Baltimore).* julio de 2017;96(29):e7585.
250. Dossa F, Chesney TR, Acuna SA, Baxter NN. A watch-and-wait approach for locally advanced rectal cancer after a clinical complete response following neoadjuvant chemoradiation: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* julio de 2017;2(7):501-13.
251. van der Valk MJM, Hilling DE, Bastiaannet E, Meershoek-Klein Kranenbarg E, Beets GL, Figueiredo NL, et al. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. *Lancet Lond Engl.* 23 de junio de 2018;391(10139):2537-45.
252. Minsky BD, Mies C, Recht A, Rich TA, Chaffey JT. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. I. Patterns of failure and survival. *Cancer.* 1 de abril de 1988;61(7):1408-16.
253. Rich T, Gunderson LL, Lew R, Galdibini JJ, Cohen AM, Donaldson G. Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. *Cancer.* 1 de octubre de 1983;52(7):1317-29.
254. Gunderson LL, Sosin H. Areas of failure found at reoperation (second or symptomatic look) following «curative surgery» for adenocarcinoma of the rectum. Clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Cancer.* octubre de 1974;34(4):1278-92.
255. Colorectal Cancer Collaborative Group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet Lond Engl.* 20 de octubre de 2001;358(9290):1291-304.

256. Douglass HO, Moertel CG, Mayer RJ, Thomas PR, Lindblad AS, Mittleman A, et al. Survival after postoperative combination treatment of rectal cancer. *N Engl J Med*. 13 de noviembre de 1986;315(20):1294-5.
257. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med*. 14 de marzo de 1991;324(11):709-15.
258. O'Connell MJ, Martenson JA, Wieand HS, Krook JE, Macdonald JS, Haller DG, et al. Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med*. 25 de agosto de 1994;331(8):502-7.
259. Smalley SR, Benedetti JK, Williamson SK, Robertson JM, Estes NC, Maher T, et al. Phase III trial of fluorouracil-based chemotherapy regimens plus radiotherapy in postoperative adjuvant rectal cancer: GI INT 0144. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de agosto de 2006;24(22):3542-7.
260. Poplin EA, Benedetti JK, Estes NC, Haller DG, Mayer RJ, Goldberg RM, et al. Phase III Southwest Oncology Group 9415/Intergroup 0153 randomized trial of fluorouracil, leucovorin, and levamisole versus fluorouracil continuous infusion and levamisole for adjuvant treatment of stage III and high-risk stage II colon cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de marzo de 2005;23(9):1819-25.
261. Cedermark B, Johansson H, Rutqvist LE, Wilking N. The Stockholm I trial of preoperative short term radiotherapy in operable rectal carcinoma. A prospective randomized trial. Stockholm Colorectal Cancer Study Group. *Cancer*. 1 de mayo de 1995;75(9):2269-75.
262. Martling A, Holm T, Johansson H, Rutqvist LE, Cedermark B, Stockholm Colorectal Cancer Study Group. The Stockholm II trial on preoperative radiotherapy in rectal carcinoma: long-term follow-up of a population-based study. *Cancer*. 15 de agosto de 2001;92(4):896-902.
263. Swedish Rectal Cancer Trial, Cedermark B, Dahlberg M, Glimelius B, Pahlman L, Rutqvist LE, et al. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med*. 3 de abril de 1997;336(14):980-7.
264. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med*. 30 de agosto de 2001;345(9):638-46.
265. Cammà C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxì A, Cottone M. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA*. 23 de agosto de 2000;284(8):1008-15.

266. Erlandsson J, Holm T, Pettersson D, Berglund Å, Cedermark B, Radu C, et al. Optimal fractionation of preoperative radiotherapy and timing to surgery for rectal cancer (Stockholm III): a multicentre, randomised, non-blinded, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. marzo de 2017;18(3):336-46.
267. Abraha I, Aristei C, Palumbo I, Lupattelli M, Trastulli S, Cirocchi R, et al. Preoperative radiotherapy and curative surgery for the management of localised rectal carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 3 de octubre de 2018;10:CD002102.
268. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Kryj M. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg*. octubre de 2006;93(10):1215-23.
269. Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouché O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de octubre de 2006;24(28):4620-5.
270. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med*. 14 de septiembre de 2006;355(11):1114-23.
271. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Pudelko M, et al. Sphincter preservation following preoperative radiotherapy for rectal cancer: report of a randomised trial comparing short-term radiotherapy vs. conventionally fractionated radiochemotherapy. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. julio de 2004;72(1):15-24.
272. Bosset JF, Calais G, Mineur L, Maingon P, Stojanovic-Rundic S, Bensadoun RJ, et al. Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study. *Lancet Oncol*. febrero de 2014;15(2):184-90.
273. Bonnetain F, Bosset JF, Gerard JP, Calais G, Conroy T, Mineur L, et al. What is the clinical benefit of preoperative chemoradiotherapy with 5FU/leucovorin for T3-4 rectal cancer in a pooled analysis of EORTC 22921 and FFCD 9203 trials: surrogacy in question? *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. agosto de 2012;48(12):1781-90.
274. McCarthy K, Pearson K, Fulton R, Hewitt J. Pre-operative chemoradiation for non-metastatic locally advanced rectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 12 de diciembre de 2012;12:CD008368.

275. De Caluwé L, Van Nieuwenhove Y, Ceelen WP. Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 28 de febrero de 2013;(2):CD006041.
276. Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, Yothers G, Deutsch M, Allegra CJ, et al. Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de noviembre de 2009;27(31):5124-30.
277. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med.* 21 de octubre de 2004;351(17):1731-40.
278. Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de junio de 2012;30(16):1926-33.
279. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med.* 30 de junio de 2005;352(26):2696-704.
280. Twelves C, Scheithauer W, McKendrick J, Seitz JF, Van Hazel G, Wong A, et al. Capecitabine versus 5-fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* mayo de 2012;23(5):1190-7.
281. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, Matzdorff A, Laechelt S, Hartmann JT, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* junio de 2012;13(6):579-88.
282. Guven DC, Yalcin S. Neoadjuvant capecitabine in rectal cancer chemoradiotherapy: too early to ring the alarms. *Intern Med J.* agosto de 2021;51(8):1365-6.
283. Sainato A, Cernusco Luna Nunzia V, Valentini V, De Paoli A, Maurizi ER, Lupattelli M, et al. No benefit of adjuvant Fluorouracil Leucovorin chemotherapy after neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced cancer of the rectum (LARC): Long term results of a randomized trial (I-CNR-RT). *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* noviembre de 2014;113(2):223-9.

284. Breugom AJ, van Gijn W, Muller EW, Berglund Å, van den Broek CBM, Fokstuen T, et al. Adjuvant chemotherapy for rectal cancer patients treated with preoperative (chemo)radiotherapy and total mesorectal excision: a Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG) randomized phase III trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* abril de 2015;26(4):696-701.
285. Glynne-Jones R, Counsell N, Quirke P, Mortensen N, Maraveyas A, Meadows HM, et al. Chronicle: results of a randomised phase III trial in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation randomising postoperative adjuvant capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) versus control. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* julio de 2014;25(7):1356-62.
286. Breugom AJ, Swets M, Bosset JF, Collette L, Sainato A, Cionini L, et al. Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* febrero de 2015;16(2):200-7.
287. Jeon YW, Park IJ, Kim JE, Park JH, Lim SB, Kim CW, et al. Evaluating the benefit of adjuvant chemotherapy in patients with ypT0-1 rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *World J Gastrointest Surg.* 27 de septiembre de 2021;13(9):1000-11.
288. Zhang H, Huang Y, Sun G, Zheng K, Lou Z, Gao XH, et al. Rectal cancer patients with downstaging after neoadjuvant chemoradiotherapy and radical resection do not benefit from adjuvant chemotherapy. *Ann Transl Med.* junio de 2020;8(12):743.
289. Giunta EF, Bregni G, Pretta A, Deleporte A, Liberale G, Bali AM, et al. Total neoadjuvant therapy for rectal cancer: Making sense of the results from the RAPIDO and PRODIGE 23 trials. *Cancer Treat Rev.* mayo de 2021;96:102177.
290. Brouwer NPM, Bos ACRK, Lemmens VEPP, Tanis PJ, Huguen N, Nagtegaal ID, et al. An overview of 25 years of incidence, treatment and outcome of colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 1 de diciembre de 2018;143(11):2758-66.
291. Erlandsson J, Lörin E, Ahlberg M, Pettersson D, Holm T, Glimelius B, et al. Tumour regression after radiotherapy for rectal cancer - Results from the randomised Stockholm III trial. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* junio de 2019;135:178-86.
292. Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, Marijnen CAM, Putter H, Kranenbarg EMK, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* enero de 2021;22(1):29-42.

293. Conroy T, Bosset JF, Etienne PL, Rio E, François É, Mesgouez-Nebout N, et al. Neoadjuvant chemotherapy with FOLFIRINOX and preoperative chemoradiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer (UNICANCER-PRODIGE 23): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* mayo de 2021;22(5):702-15.
294. Sciafani F, Corrà C, Koessler T. Debating Pros and Cons of Total Neoadjuvant Therapy in Rectal Cancer. *Cancers.* 18 de diciembre de 2021;13(24):6361.
295. Hasan S, Renz P, Wegner RE, Finley G, Raj M, Monga D, et al. Microsatellite Instability (MSI) as an Independent Predictor of Pathologic Complete Response (PCR) in Locally Advanced Rectal Cancer: A National Cancer Database (NCDB) Analysis. *Ann Surg.* abril de 2020;271(4):716-23.
296. Trojan J, Stintzing S, Haase O, Koch C, Ziegler P, Demes M, et al. Complete Pathological Response After Neoadjuvant Short-Course Immunotherapy with Ipilimumab and Nivolumab in Locally Advanced MSI-H/dMMR Rectal Cancer. *The Oncologist.* diciembre de 2021;26(12):e2110-4.
297. de Rosa N, Rodriguez-Bigas MA, Chang GJ, Veerapong J, Borrás E, Krishnan S, et al. DNA Mismatch Repair Deficiency in Rectal Cancer: Benchmarking Its Impact on Prognosis, Neoadjuvant Response Prediction, and Clinical Cancer Genetics. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de septiembre de 2016;34(25):3039-46.
298. Cercek A, Dos Santos Fernandes G, Roxburgh CS, Ganesh K, Ng S, Sanchez-Vega F, et al. Mismatch Repair-Deficient Rectal Cancer and Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de julio de 2020;26(13):3271-9.
299. Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, Van den Berg JG, Aalbers AG, Sikorska K, et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med.* abril de 2020;26(4):566-76.
300. Ludford K, Cohen R, Svrcek M, Foo WC, Colle R, Parc Y, et al. Pathological Tumor Response Following Immune Checkpoint Blockade for Deficient Mismatch Repair Advanced Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1 de febrero de 2021;113(2):208-11.
301. Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M, et al. PD-1 Blockade in Mismatch Repair-Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *N Engl J Med.* 23 de junio de 2022;386(25):2363-76.
302. Mendis S, To YH, Tie J. Biomarkers in Locally Advanced Rectal Cancer: A Review. *Clin Colorectal Cancer.* marzo de 2022;21(1):36-44.

303. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016 [citado 18 de septiembre de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>
304. The BEST Resource: Harmonizing Biomarker Terminology. 2016;2.
305. Alfonso PG. Factores pronósticos y predictivos de respuesta de utilidad clínica. IX Congr SEOM. :3.
306. Definición de factor pronóstico - Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. 2011 [citado 6 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/factor-pronostico>
307. Definición de factor predictivo - Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. 2011 [citado 6 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/factor-predictivo>
308. Zhang Y, Yan L, Wu Y, Xu M, Liu X, Guan G. Worse treatment response to neoadjuvant chemoradiotherapy in young patients with locally advanced rectal cancer. *BMC Cancer*. 5 de septiembre de 2020;20(1):854.
309. Zhang Y, Wang Y, Liu X, Chen B, Zhuang J, Li S, et al. Worse prognosis in young patients with locally advanced rectal cancer following neoadjuvant chemoradiotherapy: A comparative study. *Medicine (Baltimore)*. 28 de agosto de 2020;99(35):e21304.
310. Rosa C, Di Tommaso M, Caravatta L, Taraborrelli M, Gasparini L, Di Guglielmo FC, et al. Clinical outcomes in elderly rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy: impact of tumor regression grade: Tumor regression grade after neoadjuvant chemoradiotherapy in elderly rectal cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. abril de 2021;147(4):1179-88.
311. De Nes LCF, Heil TC, Verhoeven RHA, Lemmens VEPP, Rutten HJ, De Wilt JHW, et al. Impact of Age on Multimodality Treatment and Survival in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cancers*. 31 de mayo de 2022;14(11):2741.
312. Azam F, Latif MF, Farooq A, Tirmazy SH, AlShahrani S, Bashir S, et al. Performance Status Assessment by Using ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Score for Cancer Patients by Oncology Healthcare Professionals. *Case Rep Oncol*. diciembre de 2019;12(3):728-36.

313. Sun Y, Xu Z, Lin H, Lu X, Huang Y, Huang S, et al. Impact of body mass index on treatment outcome of neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* octubre de 2017;43(10):1828-34.
314. Kohl VKB, Weber K, Brunner M, Geppert CI, Fietkau R, Grützmann R, et al. Factors influencing downstaging after neoadjuvant long-course chemoradiotherapy in rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* junio de 2022;37(6):1355-65.
315. Park IJ, You YN, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Das P, Eng C, et al. Oncologic and Functional Hazards of Obesity Among Patients With Locally Advanced Rectal Cancer Following Neoadjuvant Chemoradiation Therapy. *Am J Clin Oncol.* junio de 2017;40(3):277-82.
316. Diefenhardt M, Ludmir EB, Hofheinz RD, Ghadimi M, Minsky BD, Fleischmann M, et al. Impact of body-mass index on treatment and outcome in locally advanced rectal cancer: A secondary, post-hoc analysis of the CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* noviembre de 2021;164:223-31.
317. Wang X, Chen G, Zhang Y, Ghareeb WM, Yu Q, Zhu H, et al. The impact of circumferential tumour location on the clinical outcome of rectal cancer patients managed with neoadjuvant chemoradiotherapy followed by total mesorectal excision. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* junio de 2020;46(6):1118-23.
318. Khan MAS, Ang CW, Hakeem AR, Scott N, Saunders RN, Botterill I. The Impact of Tumour Distance From the Anal Verge on Clinical Management and Outcomes in Patients Having a Curative Resection for Rectal Cancer. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* diciembre de 2017;21(12):2056-65.
319. Das P, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Feig BW, Chang GJ, Wolff RA, et al. Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer. *Cancer.* 1 de mayo de 2007;109(9):1750-5.
320. Yoon WS, Park W, Choi DH, Ahn YC, Chun HK, Lee WY, et al. Importance of the circumferential extent of tumors and clinical lymph node status as prognostic factors after preoperative chemoradiotherapy and surgery in patients with rectal cancer. *Tumori.* agosto de 2010;96(4):568-76.
321. Santiago I, Figueiredo N, Parés O, Matos C. MRI of rectal cancer-relevant anatomy and staging key points. *Insights Imaging.* 3 de septiembre de 2020;11(1):100.
322. Maheshwari E, Bajaj G, Jambhekar K, Pandey T, Ram R. Magnetic Resonance Imaging of Rectal Cancer. *J Gastrointest Abdom Radiol.* junio de 2019;02(01):018-32.

323. MERCURY Study Group. Diagnostic accuracy of preoperative magnetic resonance imaging in predicting curative resection of rectal cancer: prospective observational study. *BMJ*. 14 de octubre de 2006;333(7572):779.
324. Taylor FGM, Quirke P, Heald RJ, Moran B, Blomqvist L, Swift I, et al. One millimetre is the safe cut-off for magnetic resonance imaging prediction of surgical margin status in rectal cancer. *Br J Surg*. junio de 2011;98(6):872-9.
325. Taylor FGM, Quirke P, Heald RJ, Moran B, Blomqvist L, Swift I, et al. Preoperative high-resolution magnetic resonance imaging can identify good prognosis stage I, II, and III rectal cancer best managed by surgery alone: a prospective, multicenter, European study. *Ann Surg*. abril de 2011;253(4):711-9.
326. Taylor FGM, Quirke P, Heald RJ, Moran BJ, Blomqvist L, Swift IR, et al. Preoperative magnetic resonance imaging assessment of circumferential resection margin predicts disease-free survival and local recurrence: 5-year follow-up results of the MERCURY study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de enero de 2014;32(1):34-43.
327. Clinical Relevance and Practical Approach for Challenging Rectal Cancer MRI Findings | SpringerLink [Internet]. [citado 19 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40134-020-00359-x>
328. Smith NJ, Barbachano Y, Norman AR, Swift RI, Abulafi AM, Brown G. Prognostic significance of magnetic resonance imaging-detected extramural vascular invasion in rectal cancer. *Br J Surg*. febrero de 2008;95(2):229-36.
329. Bugg WG, Andreou AK, Biswas D, Toms AP, Williams SM. The prognostic significance of MRI-detected extramural venous invasion in rectal carcinoma. *Clin Radiol*. junio de 2014;69(6):619-23.
330. Zhang XY, Wang S, Li XT, Wang YP, Shi YJ, Wang L, et al. MRI of Extramural Venous Invasion in Locally Advanced Rectal Cancer: Relationship to Tumor Recurrence and Overall Survival. *Radiology*. diciembre de 2018;289(3):677-85.
331. Ale Ali H, Kirsch R, Razaz S, Jhaveri A, Thipphavong S, Kennedy ED, et al. Extramural venous invasion in rectal cancer: overview of imaging, histopathology, and clinical implications. *Abdom Radiol N Y [Internet]*. enero de 2019 [citado 19 de septiembre de 2022];44(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29967984/>
332. Schaap DP, Voogt ELK, Burger JWA, Cnossen JS, Creemers GJM, Lijnschoten I van, et al. Prognostic Implications of MRI-Detected EMVI and Tumor Deposits and Their Response to Neoadjuvant Therapy in cT3 and cT4 Rectal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 de noviembre de 2021;111(3):816-25.

333. Almlöv K, Woisetschläger M, Loftås P, Hallböök O, Elander NO, Sandström P. MRI Lymph Node Evaluation for Prediction of Metastases in Rectal Cancer. *Anticancer Res.* mayo de 2020;40(5):2757-63.
334. Definición de sarcopenia - Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. 2011 [citado 18 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/sarcopenia>
335. Chindapasirt J. Sarcopenia in Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2015;16(18):8075-7.
336. Olmez T, Ofluoglu CB, Sert OZ, Keser SH, Gulmez S, Senger AS, et al. The impact of sarcopenia on pathologic complete response following neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *Langenbecks Arch Surg.* diciembre de 2020;405(8):1131-8.
337. Chung E, Lee HS, Cho ES, Park EJ, Baik SH, Lee KY, et al. Prognostic significance of sarcopenia and skeletal muscle mass change during preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Clin Nutr Edinb Scotl.* marzo de 2020;39(3):820-8.
338. Abe S, Kawai K, Nozawa H, Sasaki K, Muroto K, Emoto S, et al. Preoperative sarcopenia is a poor prognostic factor in lower rectal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy: a retrospective study. *Int J Clin Oncol.* enero de 2022;27(1):141-53.
339. Park JW, Lim SB, Kim DY, Jung KH, Hong YS, Chang HJ, et al. Carcinoembryonic antigen as a predictor of pathologic response and a prognostic factor in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy and surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 de julio de 2009;74(3):810-7.
340. Wallin U, Rothenberger D, Lowry A, Luepker R, Mellgren A. CEA - a predictor for pathologic complete response after neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* julio de 2013;56(7):859-68.
341. Lee JH, Kim DY, Kim SH, Cho HM, Shim BY, Kim TH, et al. Carcinoembryonic antigen has prognostic value for tumor downstaging and recurrence in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy and curative surgery: A multi-institutional and case-matched control study of KROG 14-12. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* agosto de 2015;116(2):202-8.
342. Probst CP, Becerra AZ, Aquina CT, Tejani MA, Hensley BJ, González MG, et al. Watch and Wait?--Elevated Pretreatment CEA Is Associated with Decreased Pathological Complete Response in Rectal Cancer. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* enero de 2016;20(1):43-52; discussion 52.

343. Colloca G, Venturino A, Vitucci P. Pre-treatment carcinoembryonic antigen and outcome of patients with rectal cancer receiving neo-adjuvant chemo-radiation and surgical resection: a systematic review and meta-analysis. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 7 de septiembre de 2017;34(10):177.
344. Wang L, Zhong X, Lin H, Shao L, Chen G, Wu J. The Correlation Between Survival Benefit of Preoperative Radiotherapy and Pretreatment Carcinoembryonic Antigen Level in Locally Advanced Rectal Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:735882.
345. Zhang LN, OuYang PY, Xiao WW, Yu X, You KY, Zeng ZF, et al. Elevated CA19-9 as the Most Significant Prognostic Factor in Locally Advanced Rectal Cancer Following Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Medicine (Baltimore)*. noviembre de 2015;94(45):e1793.
346. Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy*. 2001;102(1):5-14.
347. Walsh SR, Cook EJ, Goulder F, Justin TA, Keeling NJ. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 1 de septiembre de 2005;91(3):181-4.
348. Cravioto-Villanueva A, Luna-Perez P, Gutierrez-de la Barrera M, Martinez-Gómez H, Maffuz A, Rojas-Garcia P, et al. Thrombocytosis as a predictor of distant recurrence in patients with rectal cancer. *Arch Med Res*. mayo de 2012;43(4):305-11.
349. Ueda T, Aoyama-Ishikawa M, Nakao A, Yamada T, Usami M, Kotani J. A simple scoring system based on neutrophil count in sepsis patients. *Med Hypotheses*. marzo de 2014;82(3):382-6.
350. Wu X, Luo Q, Su Z, Li Y, Wang H, Liu Q, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of mortality in intensive care unit patients: a retrospective analysis of the Medical Information Mart for Intensive Care III Database. *BMJ Open*. 11 de noviembre de 2021;11(11):e053548.
351. Peng L, Bao Q, Hong X, Li W, Zheng Y, Zou Z, et al. High level of neutrophil to lymphocyte ratio increases the risk of deep venous thrombosis in intensive care unit patients after oral cancer surgery: a retrospective study. *Ann Transl Med*. julio de 2022;10(14):763.
352. Balta S, Demirkol S, Aparcı M, Celik T, Ozturk C. The neutrophil lymphocyte ratio in coronary heart disease. *Int J Cardiol*. septiembre de 2014;176(1):267.
353. Yu C, Chen M, Chen Z, Lu G. Predictive and prognostic value of admission neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with CHD. *Herz*. noviembre de 2016;41(7):605-13.
354. Ma M, Liu Y, Wang L, Yang R, Li Z, Gao S, et al. Relationship Between Monocyte-to-Lymphocyte Ratio as Well as Other Leukocyte-Derived Ratios and Carotid Plaques in

- Patients with Coronary Heart Disease: A RCSCD-TCM Study. *J Inflamm Res.* 2022;15:5141-56.
355. Fan Z, Hao L, Chuanyuan T, Jun Z, Xin H, Sen L, et al. Neutrophil and Platelet to Lymphocyte Ratios in Associating with Blood Glucose Admission Predict the Functional Outcomes of Patients with Primary Brainstem Hemorrhage. *World Neurosurg.* agosto de 2018;116:e100-7.
356. Lattanzi S, Brigo F, Trinka E, Cagnetti C, Di Napoli M, Silvestrini M. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Acute Cerebral Hemorrhage: a System Review. *Transl Stroke Res.* abril de 2019;10(2):137-45.
357. Xu J, Li S, Lui KY, Song X, Hu X, Cao L, et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio: A potential predictor of poor prognosis in adult patients with trauma and traumatic brain injury. *Front Surg.* 2022;9:917172.
358. Yang M, Li L, Su N, Lin J, Wang J. [Dynamic monitoring of the neutrophil/lymphocyte ratio could predict the prognosis of patients with bloodstream infection]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* junio de 2015;27(6):471-6.
359. Liang H, Gao Y, Miao C, Song Y, He F. [Predictive value of neutrophil to lymphocyte ratio on 28-day mortality of patients with severe pneumonia]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* julio de 2019;31(7):827-31.
360. Sonaglioni A, Lombardo M, Albin A, Noonan DM, Re M, Cassandro R, et al. Charlson comorbidity index, neutrophil-to-lymphocyte ratio and undertreatment with renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors predict in-hospital mortality of hospitalized COVID-19 patients during the omicron dominant period. *Front Immunol.* 2022;13:958418.
361. Parthasarathi A, Padukudru S, Arunachal S, Basavaraj CK, Krishna MT, Ganguly K, et al. The Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Risk Stratification and Prognostication of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines.* 1 de agosto de 2022;10(8):1233.
362. Chan JCY, Chan DL, Diakos CI, Engel A, Pavlakis N, Gill A, et al. The Lymphocyte-to-Monocyte Ratio is a Superior Predictor of Overall Survival in Comparison to Established Biomarkers of Resectable Colorectal Cancer. *Ann Surg.* marzo de 2017;265(3):539-46.
363. Tan D, Fu Y, Tong W, Li F. Prognostic significance of lymphocyte to monocyte ratio in colorectal cancer: A meta-analysis. *Int J Surg Lond Engl.* julio de 2018;55:128-38.

364. Cupp MA, Cariolou M, Tzoulaki I, Aune D, Evangelou E, Berlanga-Taylor AJ. Neutrophil to lymphocyte ratio and cancer prognosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies. *BMC Med.* 20 de noviembre de 2020;18(1):360.
365. Li A, He K, Guo D, Liu C, Wang D, Mu X, et al. Pretreatment blood biomarkers predict pathologic responses to neo-CRT in patients with locally advanced rectal cancer. *Future Oncol Lond Engl.* octubre de 2019;15(28):3233-42.
366. Andras D, Crisan D, Craciun R, Nemes A, Caziuc A, Drasovean R, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio: a hidden gem in predicting neoadjuvant treatment response in locally advanced rectal cancer? *J BUON Off J Balk Union Oncol.* junio de 2020;25(3):1436-42.
367. Shen L, Zhang H, Liang L, Li G, Fan M, Wu Y, et al. Baseline neutrophil-lymphocyte ratio ( $\geq 2.8$ ) as a prognostic factor for patients with locally advanced rectal cancer undergoing neoadjuvant chemoradiation. *Radiat Oncol Lond Engl.* 18 de diciembre de 2014;9:295.
368. Dong YW, Shi YQ, He LW, Su PZ. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in rectal cancer: a meta-analysis. *OncoTargets Ther.* 2016;9:3127-34.
369. Zhang Y, Liu X, Xu M, Chen K, Li S, Guan G. Prognostic value of pretreatment systemic inflammatory markers in patients with locally advanced rectal cancer following neoadjuvant chemoradiotherapy. *Sci Rep.* 15 de mayo de 2020;10(1):8017.
370. Ke TM, Lin LC, Huang CC, Chien YW, Ting WC, Yang CC. High neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio predict poor survival in rectal cancer patients receiving neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy. *Medicine (Baltimore).* abril de 2020;99(17):e19877.
371. Lai S, Huang L, Luo S, Liu Z, Dong J, Wang L, et al. Systemic inflammatory indices predict tumor response to neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Oncol Lett.* septiembre de 2020;20(3):2763-70.
372. Shen J, Zhu Y, Wu W, Zhang L, Ju H, Fan Y, et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Locally Advanced Rectal Cancer Treated with Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 19 de enero de 2017;23:315-24.
373. Dudani S, Marginean H, Tang PA, Monzon JG, Raissouni S, Asmis TR, et al. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios as predictive and prognostic markers in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiation. *BMC Cancer.* 5 de julio de 2019;19(1):664.

374. Hamid HKS, Emile SH, Davis GN. Prognostic Significance of Lymphocyte-to-Monocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Rectal Cancer: A Systematic Review, Meta-analysis, and Meta-regression. *Dis Colon Rectum*. 1 de febrero de 2022;65(2):178-87.
375. Xiao WW, Zhang LN, You KY, Huang R, Yu X, Ding PR, et al. A Low Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Predicts Unfavorable Prognosis in Pathological T3N0 Rectal Cancer Patients Following Total Mesorectal Excision. *J Cancer*. 2015;6(7):616-22.
376. Abe S, Kawai K, Nozawa H, Hata K, Kiyomatsu T, Morikawa T, et al. LMR predicts outcome in patients after preoperative chemoradiotherapy for stage II-III rectal cancer. *J Surg Res*. febrero de 2018;222:122-31.
377. Yamamoto A, Toiyama Y, Okugawa Y, Oki S, Ide S, Saigusa S, et al. Clinical Implications of Pretreatment: Lymphocyte-to-Monocyte Ratio in Patients With Rectal Cancer Receiving Preoperative Chemoradiotherapy. *Dis Colon Rectum*. febrero de 2019;62(2):171-80.
378. Ergen ŞA, Barlas C, Yıldırım C, Öksüz DÇ. Prognostic Role of Peripheral Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR) and Platelet-Lymphocyte Ratio (PLR) in Patients with Rectal Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *J Gastrointest Cancer*. 4 de enero de 2021;
379. Wang P, Wang Z, Liu Y, Xie J, Ren Y. Prognostic value of platelet-associated biomarkers in rectal cancer patients received neoadjuvant chemoradiation: A retrospective study. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol*. abril de 2021;25(2):147-54.
380. Wk B, S SB, L B, G K, Lp F. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. mayo de 1981 [citado 19 de septiembre de 2022];34(5). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7251893/>
381. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology*. mayo de 1986;10(5):437-59.
382. Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R. From Dukes through Jass: pathological prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol*. mayo de 1994;25(5):498-505.
383. Song JH, Kim SH, Lee JH, Cho HM, Kim DY, Kim TH, et al. Significance of histologic tumor grade in rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy followed by curative surgery: A multi-institutional retrospective study. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. febrero de 2016;118(2):387-92.

384. Wu Z, Hu H, Wang C, Zhang J, Cai Y, Xie X, et al. The prognostic and predictive value of mismatch repair status in patients with locally advanced rectal cancer following neoadjuvant therapy. *Ann Transl Med.* abril de 2022;10(8):491.
385. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 de julio de 2010;28(20):3219-26.
386. de Rosa N, Rodriguez-Bigas MA, Chang GJ, Veerapong J, Borrás E, Krishnan S, et al. DNA Mismatch Repair Deficiency in Rectal Cancer: Benchmarking Its Impact on Prognosis, Neoadjuvant Response Prediction, and Clinical Cancer Genetics. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de septiembre de 2016;34(25):3039-46.
387. Lino-Silva LS, Gamboa-Domínguez A, Zúñiga-Tamayo D, Salcedo-Hernández RA, Cetina L, Cantú-de-León D. Mismatch repair protein expression and intratumoral budding in rectal cancer are associated with an increased pathological complete response to preoperative chemoradiotherapy: A case-control study. *World J Clin Oncol.* 10 de noviembre de 2018;9(7):133-9.
388. Meillan N, Vernerey D, Lefèvre JH, Manceau G, Svrcek M, Augustin J, et al. Mismatch Repair System Deficiency Is Associated With Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15 de noviembre de 2019;105(4):824-33.
389. Du C, Zhao J, Xue W, Dou F, Gu J. Prognostic value of microsatellite instability in sporadic locally advanced rectal cancer following neoadjuvant radiotherapy. *Histopathology.* abril de 2013;62(5):723-30.
390. O'Connell E, Reynolds IS, McNamara DA, Prehn JHM, Burke JP. Microsatellite instability and response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol.* septiembre de 2020;34:57-62.
391. Ni K, Zhan Y, Liu Z, Zhao XZ, Wang W, Wang G, et al. Mismatch repair system deficiency is associated with chemoradiotherapy resistance in locally advanced rectal adenocarcinoma patients. *J Surg Oncol.* marzo de 2022;125(4):692-702.
392. Chen L, Yang X, Zhang Y, Liu J, Jiang Q, Ji F, et al. Survival outcomes analysis according to mismatch repair status in locally advanced rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Front Oncol.* 2022;12:920916.

393. Garcia-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, Li W, Madoff RD, Cataldo P, et al. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Ann Surg*. septiembre de 2011;254(3):486-92; discussion 492-493.
394. Russo AL, Ryan DP, Borger DR, Wo JY, Szymonifka J, Liang WY, et al. Mutational and clinical predictors of pathologic complete response in the treatment of locally advanced rectal cancer. *J Gastrointest Cancer*. marzo de 2014;45(1):34-9.
395. Chow OS, Kuk D, Keskin M, Smith JJ, Camacho N, Pelosof R, et al. KRAS and Combined KRAS/TP53 Mutations in Locally Advanced Rectal Cancer are Independently Associated with Decreased Response to Neoadjuvant Therapy. *Ann Surg Oncol*. agosto de 2016;23(8):2548-55.
396. Bahnassy AA, Abdel-Azim YA, Ezzat S, Abdellateif MS, Zekri ARN, Mohanad M, et al. The role of circulating tumor cells and K-ras mutations in patients with locally advanced rectal cancer: a prospective study. *Mol Biol Rep*. diciembre de 2020;47(12):9645-57.
397. Duldulao MP, Lee W, Nelson RA, Li W, Chen Z, Kim J, et al. Mutations in specific codons of the KRAS oncogene are associated with variable resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with rectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. julio de 2013;20(7):2166-71.
398. Martellucci J, Alemanno G, Castiglione F, Bergamini C, Valeri A. Role of KRAS mutation as predictor of pathologic response after neoadjuvant chemoradiation therapy for rectal cancer. *Updat Surg*. marzo de 2015;67(1):47-53.
399. Bengala C, Bettelli S, Bertolini F, Sartori G, Fontana A, Malavasi N, et al. Prognostic role of EGFR gene copy number and KRAS mutation in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Br J Cancer*. 28 de septiembre de 2010;103(7):1019-24.
400. Clancy C, Burke JP, Coffey JC. KRAS mutation does not predict the efficacy of neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol*. junio de 2013;22(2):105-11.
401. Oshiro T, Uehara K, Aiba T, Mukai T, Ebata T, Nagino M. Impact of RAS/BRAF mutation status in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemotherapy. *Int J Clin Oncol*. agosto de 2018;23(4):681-8.
402. Zhou P, Goffredo P, Ginader T, Thompson D, Hrabe J, Gribovskaja-Rupp I, et al. Impact of KRAS status on tumor response and survival after neoadjuvant treatment of locally advanced rectal cancer. *J Surg Oncol*. enero de 2021;123(1):278-85.

403. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* septiembre de 2016;27(9):1746-53.
404. Peng J, Lv J, Peng J. KRAS mutation is predictive for poor prognosis in rectal cancer patients with neoadjuvant chemoradiotherapy: a systemic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis.* agosto de 2021;36(8):1781-90.
405. Zhou P, Goffredo P, Ginader T, Thompson D, Hrabe J, Gribovskaja-Rupp I, et al. Impact of KRAS status on tumor response and survival after neoadjuvant treatment of locally advanced rectal cancer. *J Surg Oncol.* enero de 2021;123(1):278-85.
406. Lee JW, Lee JH, Shim BY, Kim SH, Chung MJ, Kye BH, et al. KRAS Mutation Status Is Not a Predictor for Tumor Response and Survival in Rectal Cancer Patients Who Received Preoperative Radiotherapy With 5-Fluoropyrimidine Followed by Curative Surgery. *Medicine (Baltimore).* agosto de 2015;94(31):e1284.
407. Yokota T, Ura T, Shibata N, Takahari D, Shitara K, Nomura M, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1 de marzo de 2011;104(5):856-62.
408. Seligmann JF, Fisher D, Smith CG, Richman SD, Elliott F, Brown S, et al. Investigating the poor outcomes of BRAF-mutant advanced colorectal cancer: analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 de marzo de 2017;28(3):562-8.
409. Hasegawa H, Nagata Y, Sakakibara Y, Miyake M, Mori K, Masuda N, et al. Breast metastasis from rectal cancer with BRAF V600E mutation: a case report with a review of the literature. *Clin J Gastroenterol.* abril de 2020;13(2):153-7.
410. Jiang D, Wang X, Wang Y, Philips D, Meng W, Xiong M, et al. Mutation in BRAF and SMAD4 associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancer. *Virchows Arch Int J Pathol.* julio de 2019;475(1):39-47.
411. Sclafani F, Wilson SH, Cunningham D, Gonzalez De Castro D, Kalaitzaki E, Begum R, et al. Analysis of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and TP53 mutations in a large prospective series of locally advanced rectal cancer patients. *Int J Cancer.* 1 de enero de 2020;146(1):94-102.
412. Expresión génica [Internet]. *Genome.gov.* [citado 20 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Expresion-genica>

413. Morozova O, Hirst M, Marra MA. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:135-51.
414. Definición de ADN - Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. 2011 [citado 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/adn>
415. Institute NHGR. DNA, exons and introns [Internet]. [citado 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA\\_exons\\_introns.gif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_exons_introns.gif)
416. Molinari C, Ballardini M, Teodorani N, Giannini M, Zoli W, Emiliani E, et al. Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. *Radiat Oncol Lond Engl.* 18 de noviembre de 2011;6:161.
417. Zaki BI, Suriawinata AA, Eastman AR, Garner KM, Bakhoun SF. Chromosomal instability portends superior response of rectal adenocarcinoma to chemoradiation therapy. *Cancer.* 1 de junio de 2014;120(11):1733-42.
418. Chen Z, Liu Z, Li W, Qu K, Deng X, Varma MG, et al. Chromosomal copy number alterations are associated with tumor response to chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* septiembre de 2011;50(9):689-99.
419. do Canto LM, Barros-Filho MC, Rainho CA, Marinho D, Kupper BEC, Begnami MDF de S, et al. Comprehensive Analysis of DNA Methylation and Prediction of Response to Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Cancers.* 22 de octubre de 2020;12(11):E3079.
420. Tsang JS, Vencken S, Sharaf O, Leen E, Kay EW, McNamara DA, et al. Global DNA methylation is altered by neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer and may predict response to treatment - A pilot study. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* noviembre de 2014;40(11):1459-66.
421. Boige V, Mollevi C, Gourgou S, Azria D, Seitz JF, Vincent M, et al. Impact of single-nucleotide polymorphisms in DNA repair pathway genes on response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients: Results from ACCORD-12/PRODIGE-2 phase III trial. *Int J Cancer.* 1 de diciembre de 2019;145(11):3163-72.
422. Kim JC, Ha YJ, Roh SA, Cho DH, Choi EY, Kim TW, et al. Novel single-nucleotide polymorphism markers predictive of pathologic response to preoperative chemoradiation therapy in rectal cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 de junio de 2013;86(2):350-7.

423. Definición de transcripción - Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. 2011 [citado 20 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/transcripcion>
424. Zhang P, Wu W, Chen Q, Chen M. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinforma*. 13 de julio de 2019;16(3):20190027.
425. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de marzo de 2005;23(9):1826-38.
426. Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res*. 1 de abril de 2006;66(7):3370-4.
427. Kim IJ, Lim SB, Kang HC, Chang HJ, Ahn SA, Park HW, et al. Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. septiembre de 2007;50(9):1342-53.
428. Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, Theisen J, Mages J, Becker K, et al. Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. enero de 2008;6(1):53-61.
429. Nishioka M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Yoshikawa K, et al. Gene expression profile can predict pathological response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. abril de 2011;8(2):87-92.
430. Cecchin E, Agostini M, Pucciarelli S, De Paoli A, Canzonieri V, Sigon R, et al. Tumor response is predicted by patient genetic profile in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemo-radiotherapy. *Pharmacogenomics J*. junio de 2011;11(3):214-26.
431. Brettingham-Moore KH, Duong CP, Greenawalt DM, Heriot AG, Ellul J, Dow CA, et al. Pretreatment transcriptional profiling for predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 de mayo de 2011;17(9):3039-47.
432. Chan J, Kinsella MT, Willis JE, Hu H, Reynolds H, Delaney C, et al. A Predictive Genetic Signature for Response to Fluoropyrimidine-Based Neoadjuvant Chemoradiation in Clinical Stage II and III Rectal Cancer. *Front Oncol*. 2013;3:288.

433. Gantt GA, Chen Y, DeJulius K, Mace AG, Barnholtz-Sloan J, Kalady MF. Gene expression profile is associated with chemoradiation resistance in rectal cancer. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* enero de 2014;16(1):57-66.
434. Emons G, Auslander N, Jo P, Kitz J, Azizian A, Hu Y, et al. Gene-expression profiles of pretreatment biopsies predict complete response of rectal cancer patients to preoperative chemoradiotherapy. *Br J Cancer.* septiembre de 2022;127(4):766-75.
435. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Pretreatment expression of 13 molecular markers as a predictor of tumor responses after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *Ann Surg.* marzo de 2014;259(3):508-15.
436. Cho E, Park IJ, Yeom SS, Hong SM, Lee JB, Kim YW, et al. A Multigene Model for Predicting Tumor Responsiveness After Preoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15 de noviembre de 2019;105(4):834-42.
437. Svoboda M, Izakovicova Holla L, Sefr R, Vrtkova I, Kocakova I, Tichy B, et al. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol.* septiembre de 2008;33(3):541-7.
438. Della Vittoria Scarpati G, Falcetta F, Carlomagno C, Ubezio P, Marchini S, De Stefano A, et al. A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15 de julio de 2012;83(4):1113-9.
439. Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, Vallböhmer D, Bollschweiler E, Brabender J, et al. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Oncol.* agosto de 2011;39(2):409-15.
440. Svoboda M, Sana J, Fabian P, Kocakova I, Gombosova J, Nekvindova J, et al. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Radiat Oncol Lond Engl.* 20 de noviembre de 2012;7:195.
441. Kheirelseid EAH, Miller N, Chang KH, Curran C, Hennessey E, Sheehan M, et al. miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy. *Int J Colorectal Dis.* febrero de 2013;28(2):247-60.
442. Hotchi M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Sato H, Morimoto S, et al. microRNA expression is able to predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Mol Clin Oncol.* enero de 2013;1(1):137-42.

443. Lopes-Ramos CM, Habr-Gama A, Quevedo B de S, Felício NM, Bettoni F, Koyama FC, et al. Overexpression of miR-21-5p as a predictive marker for complete tumor regression to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *BMC Med Genomics*. 11 de diciembre de 2014;7:68.
444. Conde-Muiño R, Cano C, Sánchez-Martín V, Herrera A, Comino A, Medina PP, et al. Preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer: the sensitizer role of the association between miR-375 and c-Myc. *Oncotarget*. 10 de octubre de 2017;8(47):82294-302.
445. De Palma FDE, Luglio G, Tropeano FP, Pagano G, D'Armiento M, Kroemer G, et al. The Role of Micro-RNAs and Circulating Tumor Markers as Predictors of Response to Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 24 de septiembre de 2020;21(19):E7040.
446. Izzotti A, Ceccaroli C, Geretto M, Ruggieri FG, Schenone S, Di Maria E. Predicting Response to Neoadjuvant Therapy in Colorectal Cancer Patients the Role of Messenger-and Micro-RNA Profiling. *Cancers*. 22 de junio de 2020;12(6):E1652.
447. Machackova T, Trachtova K, Prochazka V, Grolich T, Farkasova M, Fiala L, et al. Tumor microRNAs Identified by Small RNA Sequencing as Potential Response Predictors in Locally Advanced Rectal Cancer Patients Treated With Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Cancer Genomics Proteomics*. junio de 2020;17(3):249-57.
448. Wada Y, Shimada M, Morine Y, Ikemoto T, Saito Y, Zhu Z, et al. Circulating miRNA Signature Predicts Response to Preoperative Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *JCO Precis Oncol*. 2021;5:PO.21.00015.
449. Li N, Yu J, Luo A, Tang Y, Liu W, Wang S, et al. LncRNA and mRNA signatures associated with neoadjuvant chemoradiotherapy downstaging effects in rectal cancer. *J Cell Biochem*. abril de 2019;120(4):5207-17.
450. Ferrando L, Cirmena G, Garuti A, Scabini S, Grillo F, Mastracci L, et al. Development of a long non-coding RNA signature for prediction of response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal adenocarcinoma. *PloS One*. 2020;15(2):e0226595.
451. Sposato LA, Lam Y, Karapetis C, Vatandoust S, Roy A, Hakendorf P, et al. Observation of «complete clinical response» in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation: The Flinders experience. *Asia Pac J Clin Oncol*. diciembre de 2018;14(6):439-45.
452. Kim CW, Yu CS, Yang SS, Kim KH, Yoon YS, Yoon SN, et al. Clinical significance of pre- to post-chemoradiotherapy s-CEA reduction ratio in rectal cancer patients treated with

- preoperative chemoradiotherapy and curative resection. *Ann Surg Oncol*. noviembre de 2011;18(12):3271-7.
453. Yang KL, Yang SH, Liang WY, Kuo YJ, Lin JK, Lin TC, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) level, CEA ratio, and treatment outcome of rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiation and surgery. *Radiat Oncol Lond Engl*. 1 de marzo de 2013;8:43.
454. Huang CS, Lin JK, Wang LW, Liang WY, Lin CC, Lan YT, et al. Assessment of the value of carcinoembryonic antigen reduction ratio as a prognosis factor in rectal cancer. *Am J Surg*. julio de 2014;208(1):99-105.
455. Song J, Chen Z, Huang D, Xu B. Prognostic Impact of Pretreatment Elevated and Normalized Carcinoembryonic Antigen Levels After Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Resected Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cancer Manag Res*. 2021;13:3713-21.
456. Chung MJ, Nam TK, Jeong JU, Kim SH, Kim K, Jang HS, et al. Can serum dynamics of carcinoembryonic antigen level during neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer predict tumor response and recurrence? A multi-institutional retrospective study. *Int J Colorectal Dis*. septiembre de 2016;31(9):1595-601.
457. Jeong S, Nam TK, Jeong JU, Kim SH, Kim K, Jang HS, et al. Postoperative carcinoembryonic antigen level has a prognostic value for distant metastasis and survival in rectal cancer patients who receive preoperative chemoradiotherapy and curative surgery: a retrospective multi-institutional analysis. *Clin Exp Metastasis*. diciembre de 2016;33(8):809-16.
458. Huh JW, Yun SH, Kim SH, Park YA, Cho YB, Kim HC, et al. Prognostic Role of Carcinoembryonic Antigen Level after Preoperative Chemoradiotherapy in Patients with Rectal Cancer. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. octubre de 2018;22(10):1772-8.
459. S S, Sh S, Cs K, Ys L. Prognosis Can Be Predicted More Accurately Using Pre- and Postchemoradiotherapy Carcinoembryonic Antigen Levels Compared to Only Prechemoradiotherapy Carcinoembryonic Antigen Level in Locally Advanced Rectal Cancer Patients Who Received Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. marzo de 2016 [citado 19 de septiembre de 2022];95(10). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26962798/>
460. Zheng Z, Wang X, Huang Y, Lu X, Chi P. Predictive value of changes in the level of carbohydrate antigen 19-9 in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel*. diciembre de 2020;22(12):2068-77.

461. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* septiembre de 2017;14(9):531-48.
462. Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AB, Boland P, et al. ctDNA applications and integration in colorectal cancer: an NCI Colon and Rectal-Anal Task Forces whitepaper. *Nat Rev Clin Oncol.* diciembre de 2020;17(12):757-70.
463. Tie J, Cohen JD, Wang Y, Li L, Christie M, Simons K, et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *Gut.* abril de 2019;68(4):663-71.
464. Zhou J, Wang C, Lin G, Xiao Y, Jia W, Xiao G, et al. Serial Circulating Tumor DNA in Predicting and Monitoring the Effect of Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Patients with Rectal Cancer: A Prospective Multicenter Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de enero de 2021;27(1):301-10.
465. Vidal J, Casadevall D, Bellosillo B, Pericay C, Garcia-Carbonero R, Losa F, et al. Clinical Impact of Presurgery Circulating Tumor DNA after Total Neoadjuvant Treatment in Locally Advanced Rectal Cancer: A Biomarker Study from the GEMCAD 1402 Trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de mayo de 2021;27(10):2890-8.
466. McDuff SGR, Hardiman KM, Ulintz PJ, Parikh AR, Zheng H, Kim DW, et al. Circulating Tumor DNA Predicts Pathologic and Clinical Outcomes Following Neoadjuvant Chemoradiation and Surgery for Patients With Locally Advanced Rectal Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2021;5:PO.20.00220.
467. Khakoo S, Carter PD, Brown G, Valeri N, Picchia S, Bali MA, et al. MRI Tumor Regression Grade and Circulating Tumor DNA as Complementary Tools to Assess Response and Guide Therapy Adaptation in Rectal Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de enero de 2020;26(1):183-92.
468. Wang Y, Yang L, Bao H, Fan X, Xia F, Wan J, et al. Utility of ctDNA in predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy and prognosis assessment in locally advanced rectal cancer: A prospective cohort study. *PLoS Med.* agosto de 2021;18(8):e1003741.
469. Hinz S, Röder C, Tepel J, Hendricks A, Schafmayer C, Becker T, et al. Cytokeratin 20 positive circulating tumor cells are a marker for response after neoadjuvant chemoradiation but not for prognosis in patients with rectal cancer. *BMC Cancer.* 16 de diciembre de 2015;15:953.
470. Troncarelli Flores BC, Souza E Silva V, Ali Abdallah E, Mello CAL, Gobo Silva ML, Gomes Mendes G, et al. Molecular and Kinetic Analyses of Circulating Tumor Cells as Predictive

Markers of Treatment Response in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cells*. 26 de junio de 2019;8(7):E641.

471. Patel UB, Taylor F, Blomqvist L, George C, Evans H, Tekkis P, et al. Magnetic resonance imaging-detected tumor response for locally advanced rectal cancer predicts survival outcomes: MERCURY experience. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de octubre de 2011;29(28):3753-60.
472. Patel UB, Brown G, Rutten H, West N, Sebag-Montefiore D, Glynne-Jones R, et al. Comparison of magnetic resonance imaging and histopathological response to chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol*. septiembre de 2012;19(9):2842-52.
473. Beets-Tan RGH, Lambregts DMJ, Maas M, Bipat S, Barbaro B, Curvo-Semedo L, et al. Magnetic resonance imaging for clinical management of rectal cancer: Updated recommendations from the 2016 European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) consensus meeting. *Eur Radiol*. abril de 2018;28(4):1465-75.
474. Bhoday J, Smith F, Siddiqui MR, Balyasnikova S, Swift RI, Perez R, et al. Magnetic Resonance Tumor Regression Grade and Residual Mucosal Abnormality as Predictors for Pathological Complete Response in Rectal Cancer Postneoadjuvant Chemoradiotherapy. *Dis Colon Rectum*. octubre de 2016;59(10):925-33.
475. Seo N, Kim H, Cho MS, Lim JS. Response Assessment with MRI after Chemoradiotherapy in Rectal Cancer: Current Evidences. *Korean J Radiol*. julio de 2019;20(7):1003-18.
476. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. enero de 2007;50(1):151-62.
477. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. septiembre de 2017;30(9):1299-311.
478. Du C, Xue W, Li J, Cai Y, Gu J. Morphology and prognostic value of tumor budding in rectal cancer after neoadjuvant radiotherapy. *Hum Pathol*. julio de 2012;43(7):1061-7.
479. Peng JY, Li ZN, Wang Y. Risk factors for local recurrence following neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancers. *World J Gastroenterol*. 28 de agosto de 2013;19(32):5227-37.

480. Basile D, Broudin C, Emile JF, Falcoz A, Pagès F, Mineur L, et al. Tumor budding is an independent prognostic factor in stage III colon cancer patients: a post-hoc analysis of the IDEA-France phase III trial (PRODIGE-GERCOR). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. junio de 2022;33(6):628-37.
481. Nagata K, Shinto E, Yamadera M, Shiraishi T, Kajiwara Y, Okamoto K, et al. Prognostic and predictive values of tumour budding in stage IV colorectal cancer. *BJS Open*. agosto de 2020;4(4):693-703.
482. Gavioli M, Luppi G, Losi L, Bertolini F, Santantonio M, Falchi AM, et al. Incidence and clinical impact of sterilized disease and minimal residual disease after preoperative radiochemotherapy for rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. octubre de 2005;48(10):1851-7.
483. Trotsyuk I, Sparschuh H, Müller AJ, Neumann K, Kruschewski M, Horst D, et al. Tumor budding outperforms ypT and ypN classification in predicting outcome of rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *BMC Cancer*. 1 de noviembre de 2019;19(1):1033.
484. Şirin AH, Sökmen S, Ünlü SM, Ellidokuz H, Sarioğlu S. The prognostic value of tumor budding in patients who had surgery for rectal cancer with and without neoadjuvant therapy. *Tech Coloproctology*. abril de 2019;23(4):333-42.
485. Kim S, Huh JW, Lee WY, Yun SH, Kim HC, Cho YB, et al. Prognostic Impact of Lymphatic Invasion, Venous Invasion, Perineural Invasion and Tumor Budding In Rectal Cancer Treated With Neoadjuvant Chemoradiotherapy Followed By Total Mesorectal Excision. *Dis Colon Rectum*. 21 de febrero de 2022;
486. Baert AL, editor. Circumferential Resection Margin. En: *Encyclopedia of Diagnostic Imaging [Internet]*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2008 [citado 21 de septiembre de 2022]. p. 346-346. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-35280-8\\_501](https://doi.org/10.1007/978-3-540-35280-8_501)
487. Marr R, Birbeck K, Garvican J, Macklin CP, Tiffin NJ, Parsons WJ, et al. The modern abdominoperineal excision: the next challenge after total mesorectal excision. *Ann Surg*. julio de 2005;242(1):74-82.
488. Nagtegaal ID, van de Velde CJH, Marijnen CAM, van Krieken JHJM, Quirke P, Dutch Colorectal Cancer Group, et al. Low rectal cancer: a call for a change of approach in abdominoperineal resection. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de diciembre de 2005;23(36):9257-64.
489. Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 de enero de 2008;26(2):303-12.

490. Mawdsley S, Glynne-Jones R, Grainger J, Richman P, Makris A, Harrison M, et al. Can histopathologic assessment of circumferential margin after preoperative pelvic chemoradiotherapy for T3-T4 rectal cancer predict for 3-year disease-free survival? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 de noviembre de 2005;63(3):745-52.
491. Glynne-Jones R, Mawdsley S, Novell JR. The clinical significance of the circumferential resection margin following preoperative pelvic chemo-radiotherapy in rectal cancer: why we need a common language. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* noviembre de 2006;8(9):800-7.
492. Trakarnsanga A, Gonen M, Shia J, Goodman KA, Nash GM, Temple LK, et al. What is the significance of the circumferential margin in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy? *Ann Surg Oncol.* abril de 2013;20(4):1179-84.
493. Sun Y, Lin H, Lu X, Huang Y, Xu Z, Huang S, et al. A nomogram to predict distant metastasis after neoadjuvant chemoradiotherapy and radical surgery in patients with locally advanced rectal cancer. *J Surg Oncol.* marzo de 2017;115(4):462-9.
494. Nagtegaal ID, Glynne-Jones R. How to measure tumour response in rectal cancer? An explanation of discrepancies and suggestions for improvement. *Cancer Treat Rev.* marzo de 2020;84:101964.
495. Perez RO, Habr-Gama A, Smith FM, Kosinski L, São Julião GP, Grzona E, et al. Fragmented pattern of tumor regression and lateral intramural spread may influence margin appropriateness after TEM for rectal cancer following neoadjuvant CRT. *J Surg Oncol.* junio de 2014;109(8):853-8.
496. Hav M, Libbrecht L, Geboes K, Ferdinande L, Boterberg T, Ceelen W, et al. Prognostic value of tumor shrinkage versus fragmentation following radiochemotherapy and surgery for rectal cancer. *Virchows Arch Int J Pathol.* mayo de 2015;466(5):517-23.
497. Fernández-Aceñero MJ, Estrada Muñoz L, Sastre Varela J, Corona Sánchez JA, Díaz Del Arco C, García Paredes B, et al. Prognostic influence of histopathological regression patterns in rectal adenocarcinoma receiving neoadjuvant therapy. *J Gastrointest Oncol.* febrero de 2017;8(1):49-54.
498. Bhatti ABH, Zaheer S, Shafique K. Prognostic Role of Acellular Mucin Pools in Patients with Rectal Cancer after Pathological Complete Response to Preoperative Chemoradiation: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Coll Physicians Surg--Pak JCPSP.* noviembre de 2017;27(11):714-8.
499. Cienfuegos JA, Baixauli J, Rotellar F, Arredondo J, Sola JJ, Arbea L, et al. Clinical significance of cellular and acellular mucin pools in rectal carcinoma following preoperative

- chemoradiotherapy. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* julio de 2016;18(7):714-21.
500. Shia J, McManus M, Guillem JG, Leibold T, Zhou Q, Tang LH, et al. Significance of acellular mucin pools in rectal carcinoma after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol.* enero de 2011;35(1):127-34.
501. Bhatti ABH, Akbar A, Khattak S, Kazmi AS, Jamshed A, Syed AA. Impact of acellular mucin pools on survival in patients with complete pathological response to neoadjuvant treatment in rectal cancer. *Int J Surg Lond Engl.* octubre de 2014;12(10):1123-6.
502. Kang CM, Lim SB, Hong SM, Yu CS, Hong YS, Kim TW, et al. Prevalence and clinical significance of cellular and acellular mucin in patients with locally advanced mucinous rectal cancer who underwent preoperative chemoradiotherapy followed by radical surgery. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* enero de 2016;18(1):O10-16.
503. Liersch T, Langer C, Ghadimi BM, Kulle B, Aust DE, Baretton GB, et al. Lymph node status and TS gene expression are prognostic markers in stage II/III rectal cancer after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de septiembre de 2006;24(25):4062-8.
504. Lindebjerg J, Spindler KLG, Ploen J, Jakobsen A. The prognostic value of lymph node metastases and tumour regression grade in rectal cancer patients treated with long-course preoperative chemoradiotherapy. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* marzo de 2009;11(3):264-9.
505. Vychnevskaia K, Dumont F, Agostini J, Julié C, Dartigues P, Lazure T, et al. Prognostic Value of Sterilized Lymph Nodes After Preoperative Chemoradiotherapy for Patients with ypN0 Rectal Cancer. *Ann Surg Oncol.* mayo de 2017;24(5):1304-11.
506. Delitto D, George TJ, Loftus TJ, Qiu P, Chang GJ, Allegra CJ, et al. Prognostic Value of Clinical vs Pathologic Stage in Rectal Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1 de mayo de 2018;110(5):460-6.
507. Bosset JF, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, et al. Enhanced tumorocidal effect of chemotherapy with preoperative radiotherapy for rectal cancer: preliminary results--EORTC 22921. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 de agosto de 2005;23(24):5620-7.
508. Bouzourene H, Bosman FT, Seelentag W, Matter M, Coucke P. Importance of tumor regression assessment in predicting the outcome in patients with locally advanced rectal carcinoma who are treated with preoperative radiotherapy. *Cancer.* 15 de febrero de 2002;94(4):1121-30.

509. Beddy D, Hyland JMP, Winter DC, Lim C, White A, Moriarty M, et al. A simplified tumor regression grade correlates with survival in locally advanced rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*. diciembre de 2008;15(12):3471-7.
510. Dhadda AS, Dickinson P, Zaitoun AM, Gandhi N, Bessell EM. Prognostic importance of Mandard tumour regression grade following pre-operative chemo/radiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. mayo de 2011;47(8):1138-45.
511. Slumstrup L, Eiholm S, Bennedsen ALB, Jepsen DNM, Gögenur I, Fiehn AMK. Deeper sections reveal residual tumor cells in rectal cancer specimens diagnosed with pathological complete response following neoadjuvant treatment. *Virchows Arch Int J Pathol*. mayo de 2022;480(5):1041-9.
512. Fokas E, Fietkau R, Hartmann A, Hohenberger W, Grützmann R, Ghadimi M, et al. Neoadjuvant rectal score as individual-level surrogate for disease-free survival in rectal cancer in the CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 de julio de 2018;29(7):1521-7.
513. Hermanek P, Merkel S, Hohenberger W. Prognosis of rectal carcinoma after multimodal treatment: ypTNM classification and tumor regression grading are essential. *Anticancer Res*. febrero de 2013;33(2):559-66.
514. Wasmuth HH, Rekstad LC, Tranø G. The outcome and the frequency of pathological complete response after neoadjuvant radiotherapy in curative resections for advanced rectal cancer: a population-based study. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel*. enero de 2016;18(1):67-72.
515. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Das P, Rödel C, Kuo LJ, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. septiembre de 2010;11(9):835-44.
516. Martin ST, Heneghan HM, Winter DC. Systematic review of outcomes after intersphincteric resection for low rectal cancer. *Br J Surg*. mayo de 2012;99(5):603-12.
517. Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, Barni S. Pathologic complete response and disease-free survival are not surrogate endpoints for 5-year survival in rectal cancer: an analysis of 22 randomized trials. *J Gastrointest Oncol*. febrero de 2017;8(1):39-48.
518. Sun Y, Wu X, Zhang Y, Lin H, Lu X, Huang Y, et al. Pathological complete response may underestimate distant metastasis in locally advanced rectal cancer following neoadjuvant chemoradiotherapy and radical surgery: Incidence, metastatic pattern, and risk factors. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. julio de 2019;45(7):1225-31.

519. Sclafani F, Brown G, Cunningham D, Wotherspoon A, Tait D, Peckitt C, et al. PAN-EX: a pooled analysis of two trials of neoadjuvant chemotherapy followed by chemoradiotherapy in MRI-defined, locally advanced rectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* agosto de 2016;27(8):1557-65.
520. Kong JC, Guerra GR, Warriar SK, Lynch AC, Michael M, Ngan SY, et al. Prognostic value of tumour regression grade in locally advanced rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* julio de 2018;20(7):574-85.
521. Valentini V, van Stiphout RGPM, Lammering G, Gambacorta MA, Barba MC, Bebenek M, et al. Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 de agosto de 2011;29(23):3163-72.
522. Sclafani F, Kalaitzaki E, Cunningham D, Tait D, Brown G, Chau I. Neoadjuvant rectal score: run with the hare and hunt with the hounds. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 de noviembre de 2018;29(11):2261-2.
523. Larrayoz IM, Rúa Ó, Velilla S, Martínez A. Transcriptomic profiling explains racial disparities in pterygium patients treated with doxycycline. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30 de octubre de 2014;55(11):7553-61.
524. Larráyoz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, Martínez A. Molecular effects of doxycycline treatment on pterygium as revealed by massive transcriptome sequencing. *PloS One.* 2012;7(6):e39359.
525. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* mayo de 1981;41(5):1751-6.
526. UK TI for CR. Cell line HCT116 - Mutations | canSAR Black [Internet]. canSAR Black | the Cancer Drug Discovery Platform. [citado 16 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://cansarblack.icr.ac.uk/cell-line/HCT-116/mutations>
527. HCT 116 - CCL-247 | ATCC [Internet]. [citado 16 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/ccl-247>
528. GenScript - Make Research Easy - The leader in molecular cloning and gene synthesis, peptide synthesis, protein and antibody engineering. [Internet]. [citado 16 de noviembre de 2022]. Disponible en: [https://www.genscript.com/?src=google&gclid=Cj0KCQiAsdKbBhDHARIsANJ6-jfm5qUGbAxIBFHedBdWfPkUoGvPknmUuSITJg0M-sQB2IAiN8YcaNEaAiOpEALw\\_wcB](https://www.genscript.com/?src=google&gclid=Cj0KCQiAsdKbBhDHARIsANJ6-jfm5qUGbAxIBFHedBdWfPkUoGvPknmUuSITJg0M-sQB2IAiN8YcaNEaAiOpEALw_wcB)

529. MolecularCloud | Pioneer enables the sharing of biological materials and the exchange of research ideas, biology experimental tips and lab protocols [Internet]. [citado 16 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.molecularcloud.org/>
530. Kit de extracción de ADN plasmídico ultrarápido NucleoSpin Plasmid EasyPure, 50 preps [Internet]. [citado 17 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cultek.com/kit-de-extracci-n-de-adn-plasm-dico-ultrar-pido-nucleospin-plasmid-easypure-50-preps.html>
531. BioQuoChem - BQCKit 2018 Catalogue [Internet]. 3V Chimica. 2018 [citado 18 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.3vchimica.it/en/bioquochem-bqckit-catalogue-2018/>
532. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 18 de junio de 2002;3(7):RESEARCH0034.
533. Martín-Carnicero A, Ramalle-Gomara E, Rubio-Mediavilla S, Alonso-Lago M, Zorrilla-Larraga M, Manrique-Abós I, et al. Prognostic and Predictive Biomarkers in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer (LARC) Treated with Preoperative Chemoradiotherapy. *J Clin Med.* 16 de octubre de 2022;11(20):6091.
534. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2021. [Internet]. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), 2021.; [citado 19 de julio de 2021]. Disponible en: [https://redecn.org/redecn.org/es/Informe\\_incidencia\\_REDECAN\\_2021.pdf](https://redecn.org/redecn.org/es/Informe_incidencia_REDECAN_2021.pdf)
535. Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 7 de agosto de 2014;20(29):9828-49.
536. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med.* 21 de octubre de 2004;351(17):1731-40.
537. Park YA, Sohn SK, Seong J, Baik SH, Lee KY, Kim NK, et al. Serum CEA as a predictor for the response to preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Surg Oncol.* 1 de febrero de 2006;93(2):145-50.
538. Xiao WW, Zhang LN, You KY, Huang R, Yu X, Ding PR, et al. A Low Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Predicts Unfavorable Prognosis in Pathological T3N0 Rectal Cancer Patients Following Total Mesorectal Excision. *J Cancer.* 2015;6(7):616-22.
539. Ergen ŞA, Barlas C, Yıldırım C, Öksüz DÇ. Prognostic Role of Peripheral Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR) and Platelet-Lymphocyte Ratio (PLR) in Patients with Rectal

- Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *J Gastrointest Cancer*. marzo de 2022;53(1):151-60.
540. Purim O, Gordon N, Brenner B. Cancer of the colon and rectum: potential effects of sex-age interactions on incidence and outcome. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 20 de marzo de 2013;19:203-9.
541. Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, Miller KD, Ma J, Rosenberg PS, et al. Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. *J Natl Cancer Inst*. 1 de agosto de 2017;109(8):djw322.
542. Virostko J, Capasso A, Yankeelov TE, Goodgame B. Recent trends in the age at diagnosis of colorectal cancer in the US National Cancer Data Base, 2004-2015. *Cancer*. 1 de noviembre de 2019;125(21):3828-35.
543. Stoffel EM, Murphy CC. Epidemiology and Mechanisms of the Increasing Incidence of Colon and Rectal Cancers in Young Adults. *Gastroenterology*. enero de 2020;158(2):341-53.
544. Saad El Din K, Loree JM, Sayre EC, Gill S, Brown CJ, Dau H, et al. Trends in the epidemiology of young-onset colorectal cancer: a worldwide systematic review. *BMC Cancer*. 6 de abril de 2020;20(1):288.
545. REACCT Collaborative, Zaborowski AM, Abdile A, Adamina M, Aigner F, d'Allens L, et al. Characteristics of Early-Onset vs Late-Onset Colorectal Cancer: A Review. *JAMA Surg*. 1 de septiembre de 2021;156(9):865-74.
546. Castelo M, Sue-Chue-Lam C, Paszat L, Scheer AS, Hansen BE, Kishibe T, et al. Clinical Delays and Comparative Outcomes in Younger and Older Adults with Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Curr Oncol Tor Ont*. 12 de noviembre de 2022;29(11):8609-25.
547. Peduzzi P, Concato J, Kemper E, Holford TR, Feinstein AR. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol*. diciembre de 1996;49(12):1373-9.
548. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.genecards.org/>
549. Hirao K, Natsuka Y, Tamura T, Wada I, Morito D, Natsuka S, et al. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J Biol Chem*. 7 de abril de 2006;281(14):9650-8.
550. Olivari S, Molinari M. Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. *FEBS Lett*. 31 de julio de 2007;581(19):3658-64.

551. Munkley J. The glycosylation landscape of pancreatic cancer. *Oncol Lett.* marzo de 2019;17(3):2569-75.
552. Munkley J. Glycosylation is a global target for androgen control in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* marzo de 2017;24(3):R49-64.
553. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* marzo de 2003;4(3):181-91.
554. Xu C, Ng DTW. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* diciembre de 2015;16(12):742-52.
555. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 22 de junio de 2012;13(7):448-62.
556. Polla DL, Edmondson AC, Duvet S, March ME, Sousa AB, Lehman A, et al. Bi-allelic variants in the ER quality-control mannosidase gene EDEM3 cause a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet.* 1 de julio de 2021;108(7):1342-9.
557. Scott E, Garnham R, Cheung K, Duxfield A, Elliott DJ, Munkley J. Pro-Survival Factor EDEM3 Confers Therapy Resistance in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 25 de julio de 2022;23(15):8184.
558. Drake TM, Ritchie JE, Kanthou C, Staves JJ, Narramore R, Wyld L. Targeting the endoplasmic reticulum mediates radiation sensitivity in colorectal cancer. *Exp Mol Pathol.* junio de 2015;98(3):532-9.
559. Wu HC, Meezan E, Black PH, Robbins PW. Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. I. Glucosamine-labeling patterns in 3T3, spontaneously transformed 3T3, and SV-40-transformed 3T3 cells. *Biochemistry.* junio de 1969;8(6):2509-17.
560. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol.* abril de 1999;9(2):67-81.
561. Munkley J, Elliott DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget.* 7 de junio de 2016;7(23):35478-89.
562. Bagheri-Yarmand R, Sinha KM, Li L, Lu Y, Cote GJ, Sherman SI, et al. Combinations of Tyrosine Kinase Inhibitor and ERAD Inhibitor Promote Oxidative Stress-Induced Apoptosis through ATF4 and KLF9 in Medullary Thyroid Cancer. *Mol Cancer Res MCR.* marzo de 2019;17(3):751-60.

563. LINC01433 Gene - GeneCards | LINC01433 RNA Gene [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LINC01433>
564. Yan H, Bu P. Non-coding RNA in cancer. *Essays Biochem.* 27 de octubre de 2021;65(4):625-39.
565. Yu X, Li Z, Zheng H, Chan MTV, Wu WKK. NEAT1: A novel cancer-related long non-coding RNA. *Cell Prolif.* abril de 2017;50(2):e12329.
566. Wu K, Zhao Z, Liu K, Zhang J, Li G, Wang L. Long noncoding RNA Inc-sox5 modulates CRC tumorigenesis by unbalancing tumor microenvironment. *Cell Cycle Georget Tex.* 3 de julio de 2017;16(13):1295-301.
567. Sun L, Jiang C, Xu C, Xue H, Zhou H, Gu L, et al. Down-regulation of long non-coding RNA RP11-708H21.4 is associated with poor prognosis for colorectal cancer and promotes tumorigenesis through regulating AKT/mTOR pathway. *Oncotarget.* 25 de abril de 2017;8(17):27929-42.
568. Chen N, Guo D, Xu Q, Yang M, Wang D, Peng M, et al. Long non-coding RNA FEZF1-AS1 facilitates cell proliferation and migration in colorectal carcinoma. *Oncotarget.* 8 de marzo de 2016;7(10):11271-83.
569. Wang Q, Yang L, Hu X, Jiang Y, Hu Y, Liu Z, et al. Upregulated NNT-AS1, a long noncoding RNA, contributes to proliferation and migration of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 10 de enero de 2017;8(2):3441-53.
570. Ye C, Shen Z, Wang B, Li Y, Li T, Yang Y, et al. A novel long non-coding RNA Inc-GNAT1-1 is low expressed in colorectal cancer and acts as a tumor suppressor through regulating RKIP-NF- $\kappa$ B-Snail circuit. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 3 de diciembre de 2016;35(1):187.
571. Sun ZQ, Chen C, Zhou QB, Liu JB, Yang SX, Li Z, et al. Long non-coding RNA LINC00959 predicts colorectal cancer patient prognosis and inhibits tumor progression. *Oncotarget.* 14 de noviembre de 2017;8(57):97052-60.
572. Zhou B, Yi F, Chen Y, Li CH, Cheng YS, Yang K. Reduced long noncoding RNA PGM5-AS1 facilitated proliferation and invasion of colorectal cancer through sponging miR-100-5p. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* agosto de 2020;24(15):7972-81.
573. Li XL, Subramanian M, Jones MF, Chaudhary R, Singh DK, Zong X, et al. Long Noncoding RNA PURPL Suppresses Basal p53 Levels and Promotes Tumorigenicity in Colorectal Cancer. *Cell Rep.* 5 de septiembre de 2017;20(10):2408-23.

574. Chen B, Dragomir MP, Fabris L, Bayraktar R, Knutsen E, Liu X, et al. The Long Noncoding RNA CCAT2 Induces Chromosomal Instability Through BOP1-AURKB Signaling. *Gastroenterology*. 1 de diciembre de 2020;159(6):2146-2162.e33.
575. Qu W, Huang W, Yang F, Ju H, Zhu G. Long noncoding RNA LINC00461 mediates cisplatin resistance of rectal cancer via miR-593-5p/CCND1 axis. *Biomed Pharmacother Biomedicine Pharmacother*. abril de 2020;124:109740.
576. Benitez JC, Campayo M, Díaz T, Ferrer C, Acosta-Plasencia M, Monzo M, et al. Lincp21-RNA as Predictive Response Marker for Preoperative Chemoradiotherapy in Rectal Cancer. *J Pers Med*. 16 de mayo de 2021;11(5):420.
577. Zhao K, Wang M, Kang H, Wu A. A prognostic five long-noncoding RNA signature for patients with rectal cancer. *J Cell Biochem*. 10 de noviembre de 2019;
578. Xing XL, Xing C, Huang Z, Yao ZY, Liu YW. Immune-Related lncRNAs to Construct Novel Signatures and Predict the Prognosis of Rectal Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:661846.
579. Wang DZ, Chen GY, Li YF, Zhang NW. Comprehensive analysis of long non-coding RNA and mRNA expression profile in rectal cancer. *Chin Med J (Engl)*. 5 de junio de 2020;133(11):1312-21.
580. Qian B, Wang X, Mao C, Jiang Y, Shi Y, Chen L, et al. Long non-coding RNA linc01433 promotes migration and invasion in non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*. mayo de 2018;9(5):589-97.
581. Zhang C, Qian H, Liu K, Zhao W, Wang L. A Feedback Loop Regulation Of LINC01433 And YAP Promotes Malignant Behavior In Gastric Cancer Cells. *OncoTargets Ther*. 2019;12:7949-62.
582. Wu M, Wu W, Ding J, Yang J. LINC01433/miR-2116-3p/MYC Feedback Loop Promotes Cell Proliferation, Migration, and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Cancer Biother Radiopharm*. agosto de 2019;34(6):388-97.
583. Zheng L, Liu YT, Wu CP, Jiang JT, Zhang L, Wang ZL, et al. Long non-coding RNA linc01433 promotes tumorigenesis and progression in esophageal squamous cell carcinoma by sponging miR-1301. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. mayo de 2020;24(9):4785-92.
584. Zhou M, Dong Z, Hu S, Xiao M. LINC01433 targets miR-506-3p to promote the biological progress of nasopharyngeal carcinoma cells. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. septiembre de 2021;278(9):3363-74.

585. Huang H, Bu YZ, Zhang XY, Liu J, Zhu LY, Fang Y. LINC01433 promotes hepatocellular carcinoma progression via modulating the miR-1301/STAT3 axis. *J Cell Physiol.* mayo de 2019;234(5):6116-24.
586. Hardiman KM, Ulintz PJ, Kuick RD, Hovelson DH, Gates CM, Bhasi A, et al. Intra-tumor genetic heterogeneity in rectal cancer. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* enero de 2016;96(1):4-15.
587. Frydrych LM, Ulintz P, Bankhead A, Sifuentes C, Greenson J, Maguire L, et al. Rectal cancer sub-clones respond differentially to neoadjuvant therapy. *Neoplasia N Y N.* octubre de 2019;21(10):1051-62.
588. Yang J, Lin Y, Huang Y, Jin J, Zou S, Zhang X, et al. Genome landscapes of rectal cancer before and after preoperative chemoradiotherapy. *Theranostics.* 2019;9(23):6856-66.
589. Next-Generation Sequencing (NGS) | Explore the technology [Internet]. [citado 27 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>
590. Sabour L, Sabour M, Ghorbian S. Clinical Applications of Next-Generation Sequencing in Cancer Diagnosis. *Pathol Oncol Res POR.* abril de 2017;23(2):225-34.
591. Jo P, Bernhardt M, Nietert M, König A, Azizian A, Schirmer MA, et al. KRAS mutation status concordance between the primary tumor and the corresponding metastasis in patients with rectal cancer. *PloS One.* 2020;15(10):e0239806.
592. Gaedcke J, Grade M, Jung K, Schirmer M, Jo P, Obermeyer C, et al. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* enero de 2010;94(1):76-81.
593. Lee JW, Lee JH, Shim BY, Kim SH, Chung MJ, Kye BH, et al. KRAS Mutation Status Is Not a Predictor for Tumor Response and Survival in Rectal Cancer Patients Who Received Preoperative Radiotherapy With 5-Fluoropyrimidine Followed by Curative Surgery. *Medicine (Baltimore).* agosto de 2015;94(31):e1284.
594. Rasmy A, Fayed A, Omar A, Fahmy N. Effect of KRAS mutational status on disease behavior and treatment outcome in patients with metastatic colorectal cancer: intratumor heterogeneity and mutational status. *J Gastrointest Oncol.* octubre de 2019;10(5):886-95.
595. Lee JW, Lee JH, Shim BY, Kim SH, Chung MJ, Kye BH, et al. KRAS Mutation Status Is Not a Predictor for Tumor Response and Survival in Rectal Cancer Patients Who Received Preoperative Radiotherapy With 5-Fluoropyrimidine Followed by Curative Surgery. *Medicine (Baltimore).* agosto de 2015;94(31):e1284.

596. Peng J, Lv J, Peng J. KRAS mutation is predictive for poor prognosis in rectal cancer patients with neoadjuvant chemoradiotherapy: a systemic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis.* agosto de 2021;36(8):1781-90.
597. Caputo D, Caricato M, La Vaccara V, Taffon C, Capolupo GT, Coppola R. T1 colorectal cancer: poor histological grading is predictive of lymph-node metastases. *Int J Surg Lond Engl.* 2014;12(3):209-12.
598. Cho YB, Chun HK, Yun HR, Kim HC, Yun SH, Lee WY. Histological grade predicts survival time associated with recurrence after resection for colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2009;56(94-95):1335-40.
599. Kinoshita O, Kishimoto M, Murayama Y, Yasukawa S, Konishi E, Otsuji E, et al. Poorly differentiated clusters with larger extents have a greater impact on survival: a semi-quantitative pathological evaluation for 239 patients with non-mucinous pT2-3 colorectal carcinoma. *World J Surg Oncol.* 8 de abril de 2015;13:140.
600. Choi MS, Huh JW, Shin JK, Park YA, Cho YB, Kim HC, et al. Prognostic Factors and Treatment of Recurrence after Local Excision of Rectal Cancer. *Yonsei Med J.* diciembre de 2021;62(12):1107-16.
601. Talbot IC, Ritchie S, Leighton M, Hughes AO, Bussey HJ, Morson BC. Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histological features and significance. *Histopathology.* marzo de 1981;5(2):141-63.
602. Roxburgh CSD, McMillan DC, Anderson JH, McKee RF, Horgan PG, Foulis AK. Elastica staining for venous invasion results in superior prediction of cancer-specific survival in colorectal cancer. *Ann Surg.* diciembre de 2010;252(6):989-97.
603. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer.* 1 de febrero de 2012;118(3):628-38.
604. Roxburgh CSD, McMillan DC, Richards CH, Atwan M, Anderson JH, Harvey T, et al. The clinical utility of the combination of T stage and venous invasion to predict survival in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Ann Surg.* junio de 2014;259(6):1156-65.
605. Ale Ali H, Kirsch R, Razaz S, Jhaveri A, Thippavong S, Kennedy ED, et al. Extramural venous invasion in rectal cancer: overview of imaging, histopathology, and clinical implications. *Abdom Radiol N Y.* enero de 2019;44(1):1-10.
606. Lee JH, Jang HS, Kim JG, Cho HM, Shim BY, Oh ST, et al. Lymphovascular invasion is a significant prognosticator in rectal cancer patients who receive preoperative

- chemoradiotherapy followed by total mesorectal excision. *Ann Surg Oncol*. abril de 2012;19(4):1213-21.
607. Sun Q, Liu T, Liu P, Luo J, Zhang N, Lu K, et al. Perineural and lymphovascular invasion predicts for poor prognosis in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery. *J Cancer*. 2019;10(10):2243-9.
608. Kim CH, Yeom SS, Lee SY, Kim HR, Kim YJ, Lee KH, et al. Prognostic Impact of Perineural Invasion in Rectal Cancer After Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *World J Surg*. enero de 2019;43(1):260-72.
609. Song JH, Yu M, Kang KM, Lee JH, Kim SH, Nam TK, et al. Significance of perineural and lymphovascular invasion in locally advanced rectal cancer treated by preoperative chemoradiotherapy and radical surgery: Can perineural invasion be an indication of adjuvant chemotherapy? *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. abril de 2019;133:125-31.
610. Kim YI, Kim CW, Kim JH, Kim J, Ro JS, Lee JL, et al. Clinical Implication of Perineural and Lymphovascular Invasion in Rectal Cancer Patients Who Underwent Surgery After Preoperative Chemoradiotherapy. *Dis Colon Rectum*. 1 de noviembre de 2022;65(11):1325-34.
611. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de agosto de 2003;21(15):2912-9.
612. Leibold T, Shia J, Ruo L, Minsky BD, Akhurst T, Gollub MJ, et al. Prognostic implications of the distribution of lymph node metastases in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de mayo de 2008;26(13):2106-11.
613. Manceau G, Margot N, Augustin J, Bardier A, Simon JM, Bachet JB, et al. YpN0 rectal cancer patients with sterilized lymph nodes after neoadjuvant chemoradiotherapy are of greater risk of recurrence. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. febrero de 2020;52(2):214-20.
614. Sobin LH, Greene FL. TNM classification: clarification of number of regional lymph nodes for pNo. *Cancer*. 15 de julio de 2001;92(2):452.
615. Morcos B, Baker B, Al Masri M, Haddad H, Hashem S. Lymph node yield in rectal cancer surgery: effect of preoperative chemoradiotherapy. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. abril de 2010;36(4):345-9.

616. Miller ED, Robb BW, Cummings OW, Johnstone PAS. The effects of preoperative chemoradiotherapy on lymph node sampling in rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. septiembre de 2012;55(9):1002-7.
617. Yegen G, Keskin M, Büyük M, Kunduz E, Balık E, Sağlam EK, et al. The effect of neoadjuvant therapy on the size, number, and distribution of mesorectal lymph nodes. *Ann Diagn Pathol*. febrero de 2016;20:29-35.
618. Mechera R, Schuster T, Rosenberg R, Speich B. Lymph node yield after rectal resection in patients treated with neoadjuvant radiation for rectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. febrero de 2017;72:84-94.
619. Lin YM, Chou CL, Kuo YH, Wu HC, Tsai CJ, Ho CH, et al. Optimal Lymph Node Yield for Survival Prediction in Rectal Cancer Patients After Neoadjuvant Therapy. *Cancer Manag Res*. 2021;13:8037-47.
620. Lin Z, Li X, Song J, Zheng R, Chen C, Li A, et al. The Effect of Lymph Node Harvest on Prognosis in Locally Advanced Middle-Low Rectal Cancer After Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Front Oncol*. 2022;12:816485.
621. Rullier A, Laurent C, Capdepon M, Vendrely V, Belleannée G, Bioulac-Sage P, et al. Lymph nodes after preoperative chemoradiotherapy for rectal carcinoma: number, status, and impact on survival. *Am J Surg Pathol*. enero de 2008;32(1):45-50.
622. Madbouly KM, Abbas KS, Hussein AM. Metastatic lymph node ratio in stage III rectal carcinoma is a valuable prognostic factor even with less than 12 lymph nodes retrieved: a prospective study. *Am J Surg*. junio de 2014;207(6):824-31.
623. Abdel-Misih SRZ, Wei L, Benson AB, Cohen S, Lai L, Skibber J, et al. Neoadjuvant Therapy for Rectal Cancer Affects Lymph Node Yield and Status Without Clear Implications on Outcome: The Case for Eliminating a Metric and Using Preoperative Staging to Guide Therapy. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. diciembre de 2016;14(12):1528-34.
624. Chan DKH, Tan KK. Lower lymph node yield following neoadjuvant therapy for rectal cancer has no clinical significance. *J Gastrointest Oncol*. febrero de 2019;10(1):42-7.
625. Box B, Lindsey I, Wheeler JM, Warren BF, Cunningham C, George BD, et al. Neoadjuvant therapy for rectal cancer: improved tumor response, local recurrence, and overall survival in nonanemic patients. *Dis Colon Rectum*. junio de 2005;48(6):1153-60.
626. Rades D, Kuhn H, Schultze J, Homann N, Brandenburg B, Schulte R, et al. Prognostic factors affecting locally recurrent rectal cancer and clinical significance of hemoglobin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 15 de marzo de 2008;70(4):1087-93.

627. McGrane JM, Humes DJ, Acheson AG, Minear F, Wheeler JMD, Walter CJ. Significance of Anemia in Outcomes After Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. diciembre de 2017;16(4):381-5.
628. Gui W, Wang X, Luo Y, Wang J. Platelet to lymphocyte ratio as a prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer undergoing palliative treatment. *Ann Palliat Med*. septiembre de 2020;9(5):3271-7.
629. Li Z, Zhao R, Cui Y, Zhou Y, Wu X. The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio can predict clinical outcome in stage I-III colon cancer. *Sci Rep*. 21 de junio de 2018;8(1):9453.
630. Ashizawa N, Furuya S, Katsutoshi S, Sudo M, Akaike H, Hosomura N, et al. Clinical Significance of Dynamic Neutrophil-lymphocyte Ratio Changes in Patients With Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. abril de 2020;40(4):2311-7.
631. Nemoto T, Endo S, Isohata N, Takayanagi D, Nemoto D, Aizawa M, et al. Change in the neutrophil-to-lymphocyte ratio during chemotherapy may predict prognosis in patients with advanced or metastatic colorectal cancer. *Mol Clin Oncol*. mayo de 2021;14(5):107.
632. Herold Z, Herold M, Lohinszky J, Szasz AM, Dank M, Somogyi A. Longitudinal changes in personalized platelet count metrics are good indicators of initial 3-year outcome in colorectal cancer. *World J Clin Cases*. 16 de julio de 2022;10(20):6825-44.
633. Fokas E, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Beissbarth T, Hess C, et al. Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de mayo de 2014;32(15):1554-62.
634. Fokas E, Ströbel P, Fietkau R, Ghadimi M, Liersch T, Grabenbauer GG, et al. Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy as a Prognostic Factor and Individual-Level Surrogate for Disease-Free Survival in Rectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1 de diciembre de 2017;109(12).
635. McCoy MJ, Hemmings C, Hillery S, Penter C, Bulsara MK, Zeps N, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer: how important is tumour regression? *ANZ J Surg*. diciembre de 2017;87(12):E233-9.
636. Xu L, Cai S, Xiao T, Chen Y, Qiu H, Wu B, et al. Prognostic significance of tumour regression grade after neoadjuvant chemoradiotherapy for a cohort of patients with locally advanced rectal cancer: an 8-year retrospective single-institutional study. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel*. julio de 2017;19(7):O263-71.

637. Tominaga T, Akiyoshi T, Yamamoto N, Oba K, Nagasaki T, Yamaguchi T, et al. Prognostic value of metastatic lymph node regression grade after neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer. *Surgery*. diciembre de 2019;166(6):1061-7.
638. Petersen SH, Harling H, Kirkeby LT, Wille-Jørgensen P, Mocellin S. Postoperative adjuvant chemotherapy in rectal cancer operated for cure. *Cochrane Database Syst Rev*. 14 de marzo de 2012;2012(3):CD004078.
639. Hong YS, Nam BH, Kim KP, Kim JE, Park SJ, Park YS, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus fluorouracil and leucovorin as adjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy (ADORE): an open-label, multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. octubre de 2014;15(11):1245-53.
640. Zhao L, Liu R, Zhang Z, Li T, Li F, Liu H, et al. Oxaliplatin/fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel*. agosto de 2016;18(8):763-72.
641. Bujko K, Glynne-Jones R, Bujko M. Does adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy provide a benefit for patients with resected rectal cancer who have already received neoadjuvant radiochemotherapy? A systematic review of randomised trials. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. septiembre de 2010;21(9):1743-50.
642. Bujko K, Glimelius B, Valentini V, Michalski W, Spalek M. Postoperative chemotherapy in patients with rectal cancer receiving preoperative radio(chemo)therapy: A meta-analysis of randomized trials comparing surgery ± a fluoropyrimidine and surgery + a fluoropyrimidine ± oxaliplatin. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. junio de 2015;41(6):713-23.
643. Tamburini E, Tassinari D, Ramundo M, De Stefano A, Viola MG, Romano C, et al. Adjuvant chemotherapy after neoadjuvant chemo-radiotherapy and surgery in locally advanced rectal cancer. A systematic review of literature with a meta-analysis of randomized clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol*. abril de 2022;172:103627.
644. Gao C, Li JT, Fang L, Wen SW, Zhang L, Zhao HC. Pre-operative predictive factors for intra-operative pathological lymph node metastasis in rectal cancers. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2013;14(11):6293-9.
645. Gao C, Fang L, Li JT, Zhao HC. Significance and prognostic value of increased serum direct bilirubin level for lymph node metastasis in Chinese rectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 28 de febrero de 2016;22(8):2576-84.



## 8. ANEXOS

---



## 8. Anexos

### Anexo I. Hoja de información al paciente

#### **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE**

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** “BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES PARA EL CÁNCER COLORRECTAL Y NUEVAS TERAPIAS BASADAS EN LOS PRODUCTOS DEL GEN DE LA ADRENOMEDULINA”

**INVESTIGADORES:** Alfredo Martínez Ramírez. Edelmira Vélez de Mendizábal. Alfonso Martín Carnicero. Martina Alonso Lago. Susana Rubio Mediavilla.

**CENTRO:** Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR)

#### **INTRODUCCIÓN**

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de La Rioja.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

#### **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

#### **DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO**

El Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) en colaboración con los servicios de Anatomía Patológica, Oncología Médica, Oncología Radioterápica y Cirugía general del Hospital San Pedro y el servicio de Anatomía Patológica la Fundación Hospital de Calahorra van a desarrollar un proyecto de investigación financiado por el Instituto de Salud Carlos III de Madrid denominado “Búsqueda de nuevos marcadores para el cáncer colorrectal y nuevas terapias basadas en los productos del gen de la adrenomedulina”.

El objetivo de este estudio es identificar de manera retrospectiva y mediante la técnica de ultrasecuenciación, factores moleculares predictivos de respuesta a quimiorradioterapia preoperatoria en biopsias tumorales de pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de recto localizado y localmente avanzado, para luego comparando estos resultados con la evolución clínica de los pacientes y poder extrapolar conclusiones.

Una vez otorgado el consentimiento, el análisis se realiza sobre la biopsia tumoral tomada por endoscopia en el momento del diagnóstico. Sobre la muestra se realizará extracción de RNA y transcripción inversa para luego someter el cDNA conseguido a ultrasecuenciación. Posteriormente se comprobarán los resultados mediante RT-PCR y otras técnicas.

## **BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.**

Al tratarse de un estudio realizado sobre tejido tumoral ya extraído y almacenado en los departamentos de Anatomía Patológica de los hospitales colaboradores, no es necesario que usted se someta a ningún procedimiento analítico, diagnóstico o terapéutico. Por tanto, no existe ningún riesgo para su salud.

Este estudio tiene un carácter exclusivamente científico y por tanto, es altamente probable que tampoco obtenga ningún beneficio para su salud por su participación.

## **CONFIDENCIALIDAD**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo requerimiento legal.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias, Comunidades Autónomas (inspección), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

## **DATOS DE CONTACTO**

[Redacted contact information]

[Redacted contact information]

[Redacted contact information]

Anexo II. Consentimiento informado

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO MOLECULAR “BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES PARA EL CÁNCER COLORRECTAL Y NUEVAS TERAPIAS BASADAS EN LOS PRODUCTOS DEL GEN DE LA ADRENOMEDULINA” EN BIOPSIA TUMORAL**

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(Nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º.- Cuando quiera.

2º.- Sin tener que dar explicaciones.

3º.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad, no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio):

Sí

NO

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Fecha:

Nombre:

Fecha:

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO MOLECULAR “BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES PARA EL CÁNCER COLORRECTAL Y NUEVAS TERAPIAS BASADAS EN LOS PRODUCTOS DEL GEN DE LA ADRENOMEDULINA” EN BIOPSIA TUMORAL**

Yo (nombre y apellidos) .....  
en calidad de .....(relación con el participante)  
de.....(nombre y apellidos del participante).

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(Nombre del investigador)

Comprendo que la participación del paciente es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

1º.- Cuando quiera.

2º.- Sin tener que dar explicaciones.

3º.- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

- Se me ha proporcionado toda la información pertinente del estudio por lo que presto mi conformidad para que..... (nombre del participante) participe en este estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de los datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad, no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio):

SÍ

NO

Firma del representante:

Firma del investigador:

Nombre:

Fecha:

Nombre:

Fecha:



Article

---

# Prognostic and Predictive Biomarkers in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer (LARC) Treated with Preoperative Chemoradiotherapy

---

Alfonso Martín-Carricero, Enrique Ramalle-Gomara, Susana Rubio-Mediavilla, Martina Alonso-Lago, Miriam Zorrilla-Larraga, Isabel Manrique-Abós, María E. de las Heras-Dueña, Ignacio M. Larrayoz and Alfredo Martínez



<https://doi.org/10.3390/jcm11206091>



Article

# Prognostic and Predictive Biomarkers in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer (LARC) Treated with Preoperative Chemoradiotherapy

Alfonso Martín-Carnicero <sup>1</sup>, Enrique Ramalle-Gomara <sup>2</sup>, Susana Rubio-Mediavilla <sup>3</sup>, Martina Alonso-Lago <sup>1</sup>, Miriam Zorrilla-Larraga <sup>1</sup>, Isabel Manrique-Abós <sup>1</sup>, María E. de las Heras-Dueña <sup>4</sup>, Ignacio M. Larrayoz <sup>5,6,†</sup> and Alfredo Martínez <sup>7,\*,†</sup>

<sup>1</sup> Medical Oncology Department, Hospital San Pedro, 26006 Logroño, Spain

<sup>2</sup> Department of Epidemiology, La Rioja Government, 26071 Logroño, Spain

<sup>3</sup> Pathology Service, Hospital San Pedro, 26006 Logroño, Spain

<sup>4</sup> Healthcare Center, 26143 Murillo de Río Leza, Spain

<sup>5</sup> Biomarkers and Molecular Signaling Group, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), 26006 Logroño, Spain

<sup>6</sup> Unidad Predepartamental de Enfermería, Universidad de La Rioja (UR), 26006 Logroño, Spain

<sup>7</sup> Angiogenesis Group, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), 26006 Logroño, Spain

\* Correspondence: amartinezr@riojasalud.es; Tel.: +34-941278775

† These authors contributed equally to this work.



check for  
updates

**Citation:** Martín-Carnicero, A.; Ramalle-Gomara, E.; Rubio-Mediavilla, S.; Alonso-Lago, M.; Zorrilla-Larraga, M.; Manrique-Abós, I.; de las Heras-Dueña, M.E.; Larrayoz, I.M.; Martínez, A. Prognostic and Predictive Biomarkers in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer (LARC) Treated with Preoperative Chemoradiotherapy. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 6091. <https://doi.org/10.3390/jcm11206091>

Academic Editor: Giovanni Domenico De Palma

Received: 14 September 2022

Accepted: 14 October 2022

Published: 16 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) is one of the standards of care in locally advanced rectal cancer (LARC). This retrospective study examines clinical, analytical, and pathological parameters collected from 77 patients with locally advanced (cT3-4 or cN+) rectal carcinoma diagnosed between 2007 and 2017 at our institution that were treated with preoperative CRT and surgery. In the prognosis analysis, lower hemoglobin levels ( $p = 0.008$ ), lower lymphocyte/monocyte ratio (LMR) ( $p = 0.011$ ), and higher platelet/lymphocyte ratio (PLR) ( $p = 0.029$ ) in the second determination (Hb2, LMR2 and PLR2) were associated with the relapse group. The number of positive nodes after surgery (N+) showed a statistically significant association with relapse ( $p = 0.012$ ). KRAS mutations were associated with a worse prognosis for 5 years progression-free and overall survival ( $p = 0.005$  and  $0.022$ ; respectively). We propose a prognostic model based on four parameters (number of positive lymph nodes after surgery, hemoglobin levels, LMR, and PLR after neoadjuvant therapy) that can be a useful tool to estimate relapse risk. Moreover, bilirubin could be a useful parameter to predict the response to neoadjuvant CRT.

**Keywords:** locally advanced rectal cancer; neoadjuvant chemoradiotherapy; prognostic biomarkers; predictive biomarkers; hemoglobin; lymphocyte/monocyte ratio; platelet/lymphocyte ratio; positive nodes after surgery; KRAS mutations; bilirubin

## 1. Introduction

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third malignancy in incidence among men, after prostate and lung cancer, and the second in women after breast cancer, with more than 1.9 million new cases per year and an estimated mortality of 935,000 deaths in the year 2020 [1]. Approximately 30% of CRCs are located in the rectum. Currently, one of the standard treatments for locally advanced rectal cancer (LARC) is neoadjuvant chemoradiotherapy (nCRT) followed by surgery based on total mesorectal excision [2–4]. This approach has been shown to reduce local recurrence rates and toxicity compared to the administration of adjuvant CRT, although no differences in overall survival (OS) have been shown.

Around 60% of patients treated with nCRT will achieve a certain degree of pathological response, with a variable percentage of pathological complete responses (pCR) ranging

from 10–20% [5,6]. This tumor regression grade has been considered a surrogate marker of survival regardless of clinicopathological parameters [7,8]; however, the high number of response grading scores [9–14] discourages the use of this parameter in daily clinical practice. In addition, and except for clinical-pathological parameters, there are currently no validated biomarkers that allow us to predict either the response to combined nCRT treatment or to determine the risk of relapse in our patients. Numerous authors have tried to find molecular biomarkers either in blood or tissue based on inflammation parameters, DNA or miRNA microarrays, mutations and DNA methylation patterns, circulating tumor cells, and even metabolites, all of them with sometimes contradictory results and never validated in large prospective series [15–17]. In this regard, the tumor heterogeneity characteristic of rectal cancer could play an important role in this discrepancy.

The aim of this study was to correlate clinical, laboratory, and pathological data with response to treatment and survival in a cohort of patients with LARC treated at our center with nCRT followed by surgery, in order to identify prognostic factors for survival and predictive factors for response to CRT.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

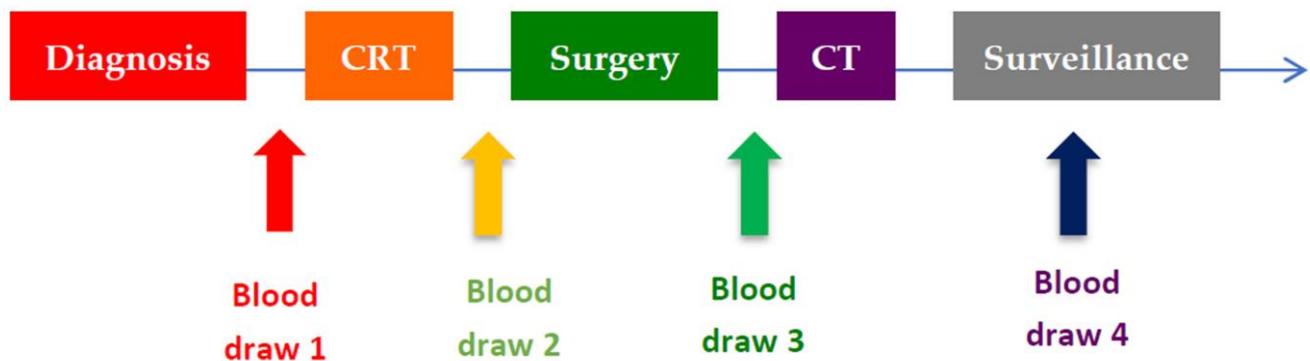
Initially, 92 patients with LARC (T3/4 and/or N+) treated with nCRT between March 2007 and August 2017 were pre-selected, but 15 patients had to be excluded since their histopathological samples were deteriorated. As a result, a total of 77 patients were included and analyzed. The study was approved by the Medical Research Ethics Committee of La Rioja (CEICLAR, protocol number 129) and all patients signed the informed consent before inclusion.

### 2.2. Treatment Protocol

All patients were treated with a long course of radiotherapy (44–45 Gy) and concomitant chemotherapy for five weeks. Continuous infusion of 5-fluorouracil (5FUci: 225 mg/m<sup>2</sup>/day), capecitabine (875 mg/m<sup>2</sup>/12 h every day) and FOLFOX-6 (5FU bolus 400 mg/m<sup>2</sup>), leucovorin (400 mg/m<sup>2</sup>), oxaliplatin (85 mg/m<sup>2</sup>), and 5FUci (2400 mg/m<sup>2</sup> every two weeks) were the applied chemotherapy schemes. Surgery was performed according to the principles of total mesorectal excision 7–9 weeks after completion of chemoradiotherapy. After surgery, all patients were offered adjuvant chemotherapy with 5FU (continuous infusion or capecitabine), either as monotherapy or associated with oxaliplatin, depending on the pathological stage.

### 2.3. Evaluation

Clinical data collected included age, sex, distance from the anal margin, smoking history, and clinical stage according to the 8th edition of the AJCC (cTNM) as confirmed by body CT and pelvic MRI. We calculated the days from the diagnosis to the start of CRT (CRTDD), the days from the end of CRT to surgery (CRTSD), the days from diagnosis to surgery (DSD), and the days from surgery to the beginning of adjuvant CRT (aCRT), if received (SCTD). In addition, progression-free survival (PFS) was calculated, defined as the time interval between the start of CRT and the date of relapse, and OS as the time elapsed from the start of CRT to the last date of study closure. All patients included in the study had four blood tests: the first or baseline before the start of CRT, the second prior to surgery, the third after surgery and prior to adjuvant chemotherapy treatment if the patient received it. The fourth was after the end of adjuvant CT or, otherwise, at the first review (Figure 1).



**Figure 1.** Timeline of blood draws. CRT: chemoradiotherapy; CT: chemotherapy.

From each blood draw, the counts of leukocytes, neutrophils, monocytes, hemoglobin, and platelets were recorded. In addition, the neutrophil/lymphocyte ratio (NLR), the lymphocyte/monocyte ratio (LMR), and the platelet/lymphocyte ratio (PLR) were calculated. From the basal analysis, the values of glucose, urea, creatinine, uric acid, sodium, potassium, triglycerides, cholesterol, LDH, GOT, GPT, bilirubin, alkaline phosphatase, ferritin, iron, calcium, total proteins, albumin, and CEA (carcinoembryonic antigen) before CRT were also obtained.

KRAS mutations and microsatellite instability (MSI) were determined from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tumor lesions. To evaluate the degree of tumor regression (TRG) to CRT, the modified Ryan classification system recommended by the American College of Pathologists [13] was used. Tumors were classified according to the 8th edition of the AJCC-TNM classification [12] after neoadjuvant treatment (ypTNM). Data on other known prognostic factors such as vascular, lymphatic, and perineural permeation, as well as the number of affected and resected lymph nodes, were also recorded.

#### 2.4. Statistical Analysis

The characteristics of the patients were described by means and standard deviations, medians and interquartile ranges, or frequencies and percentages, depending on the normality and nature of the variables.

Patients were classified according to recurrence and tumor regression grade to make comparisons between groups using comparison tests for independent samples such as Student's *t*, Mann–Whitney *U*, or Fisher tests. The logistic regression model was also used to study the influence of the different variables on relapse and response, and for which ROC curves were used to define a predictive and prognostic model. The Kaplan–Meier method was used for the analysis of OS and progression-free survival (PFS) and the log-rank test and the Cox proportional hazards model were used to compare the survival between groups. Differences were considered statistically significant for a two-tailed test when  $p < 0.05$ . Version 20.0 of SPSS Inc., Chicago, IL, USA was used for all statistical analyses.

### 3. Results

#### 3.1. Patients Characteristics

The median (Q1–Q3) follow-up was 10.7 (3.72–13.67) years. The study sample consisted on 77 patients, 21 (27.3%) women and 56 (72.7%) men. The median age was 62 (30–79) years. A total of 73 patients (94.8%) had a clinical stage  $\geq$ T3N0. The median distance from the tumor to the anal margin was 7 (1–15) cm; the majority were in the middle and lower rectum (88.3%). A total of 41 (53.2%) patients had a history of smoking (active smokers or former smokers). The median preoperative CEA was 5.4 (0.6–77.5) ng/mL. The median number of days from diagnosis to the start of CRT was 55 (14–100) days, while the days from CRT to surgery, from diagnosis to surgery, and from surgery to start of aCRT was 49, 141, and 45 days, respectively. A total of 52 (67.5%) patients were treated with 5FUic, 24 (31.2%) patients received capecitabine, while 1 of the patients received FOLFOX-6

(1.3%), all of them concomitant with radiotherapy. A total of 33 (42.9%) patients underwent abdominoperineal amputation at surgery. A total of 36 (46.8%) patients presented ypTNM  $\geq$  T3N0 (Table 1).

**Table 1.** Univariate analysis comparing groups.

Factor	Relapse Group	No Relapse Group	p-Value
Number of patients, <i>n</i> (%)	31 (40)	46 (60)	
Age at diagnosis (median/sd)	63.5/9.5	61.7/10.5	0.445
Male:Female ( <i>n</i> )	23:8	34:12	1.000
cTNM $\geq$ T3N0, <i>n</i> (%)	29 (40)	44 (60)	1.000
MSI, <i>n</i> (%)	2 (22)	7 (78)	0.301
KRAS mutations, <i>n</i> (%)	12 (63)	7 (37)	<b>0.028</b>
Low LARC (0–5 cm), <i>n</i> (%)	11 (34)	22 (66)	0.350
Medium LARC (6–10 cm), <i>n</i> (%)	15 (43)	20 (57)	0.816
Upper LARC (11–15 cm), <i>n</i> (%)	5 (56)	4 (44)	0.472
Smoking history, <i>n</i> (%)	16 (39)	25 (61)	0.821
CEA levels, ng/mL (median/sd)	14.9/18.3	7.4/13.6	0.057
Neoadjuvant 5-FU/LVci, <i>n</i> (%)	20 (38)	32 (62)	0.619
TDSNT, days (mean/sd)	53.1/18.7	54.3/15.9	0.762
TENTS, days (mean/sd)	48.4/9.2	47.6/11.3	0.732
TDS, days (mean/sd)	140.8/22.6	141.2/21.4	0.943
TSAC, days (mean/sd)	59.7/38.0	46.33/17.1	0.112
APA, <i>n</i> (%)	16 (48)	17 (52)	0.236
ypTNM $\geq$ T3N0, <i>n</i> (%)	20 (56)	16 (44)	<b>0.019</b>
TRG0, <i>n</i> (%)	2 (29)	5 (71)	0.703
TRG1, <i>n</i> (%)	7 (33)	14 (67)	0.791
TRG2, <i>n</i> (%)	11 (33)	22 (67)	0.630
TRG3, <i>n</i> (%)	8 (62)	5 (38)	0.065
EMVI, <i>n</i> (%)	6 (75)	2 (25)	<b>0.048</b>
Lymphatic invasion, <i>n</i> (%)	7 (78)	2 (12)	<b>0.023</b>
Perineural invasion, <i>n</i> (%)	13 (87)	2 (13)	<b>&lt;0.001</b>
Lymph node involved, <i>n</i> (%)	14 (70)	6 (30)	<b>0.001</b>
Positive lymph nodes (mean/sd)	3/5.8	0.3/1.2	<b>0.001</b>
Resected lymph nodes (mean/sd)	10.0/7.0	8.8/5.5	0.600

Abbreviations: MSI: Microsatellite Instability. TDSNT: Time from diagnosis to start of neoadjuvant treatment. TENTS: Time from the end of neoadjuvant treatment to surgery. TDS: Time from diagnosis to surgery. TSAC: Time from surgery to start of aCRT. APA: Abdomino-perineal amputation. EMVI: Extramural venous invasion. Statistically significant differences are indicated in bold.

Histopathologically, 9 (12%) patients had microsatellite instability (MSI) and 19 (25%) patients had KRAS mutations. Regarding the tumoral response grading, we have data from 74 of the 77 (96.1%) patients. Of these, 28 (36.4%) patients presented TRG0-1 (7 TRG0), while 46 (59.7%) presented TRG2-3 (13 TRG3). After surgery, analysis of the surgical specimen showed that 8 (11.4%) patients had vascular permeation, 9 (11.7%) lymphatic permeation, and 15 (19.5%) perineural permeation. A total of 20 (26.7%) patients had lymph node involvement, with an average of 9.28 (0–32) isolated nodes and a mean of 1.39 (0–29) infiltrated nodes (Table 1).

### 3.2. Prognosis Factors

Throughout the follow-up period, 32 (41.6%) patients relapsed, while 45 (58.4%) did not. In the univariate analysis of clinical and pathological characteristics (Table 1), statistically significant differences were only found for KRAS mutations ( $p = 0.030$ ), extramural venous invasion (EMVI) ( $p = 0.048$ ), lymphatic invasion ( $p = 0.022$ ) and perineural invasion ( $p < 0.001$ ), lymph node involvement ( $p < 0.001$ ), and the median number of infiltrated lymph nodes ( $p = 0.001$ ). Regarding the pathologic response criteria to chemoradiation therapy, there were no differences in tumor regression score (TRG), although statistically

significant differences were observed in the pathological TNM staging ( $ypTNM \geq T3N0$ ;  $p = 0.020$ ).

In the univariate analysis of hematological data (Tables 2 and 3), statistically significant differences were obtained in hemoglobin levels at the second (Hb2) and third (Hb3) blood draws ( $p = 0.008$  and  $0.007$ , respectively), in the lymphocyte/monocyte ratio at the second blood draw (LMR2) ( $p = 0.011$ ), in the platelet/lymphocyte ratio also at the second blood draw (PLR2) ( $p = 0.029$ ), and in the ferritin levels ( $p = 0.025$ ) in the biochemical data (Supplementary Table S1).

**Table 2.** Univariate analysis of hematologic parameters.

Characteristics	Relapse Group	No Relapse Group	p-Value
Leukocyte 1, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	8146.0/3413.2	7697.5/1914.1	0.930
Leukocyte 2, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	5927.1/3491.2	5195.5/1277.0	0.781
Leukocyte 3, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	6448.1/2129.8	6733.3/2567.8	0.754
Leukocyte 4, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	5305/1599.1	5488.1/1755.5	0.694
Neutrophil 1, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	5124.6/2872.8	4500/1390.6	0.493
Neutrophil 2, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	4262.5/3173.8	3364.4/1085.0	0.812
Neutrophil 3, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	4576.6/1887.2	4912.1/2500.6	0.839
Neutrophil 4, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	3555/1396.4	3590.4/1535.2	0.898
Lymphocyte 1, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	2140/798.2	2300/850.6	0.437
Lymphocyte 2, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	859.2/382.0	1051.1/486.4	0.076
Lymphocyte 3, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	1007.0/529.0	1004.0/506.0	0.981
Lymphocyte 4, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	1070/432.9	1178.5/481.1	0.395
Monocyte 1, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	654.6/256.9	630/224.4	0.746
Monocyte 2, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	599.6/236.0	520/173.9	0.267
Monocyte 3, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	592.2/298.8	579.0/188.9	0.433
Monocyte 4, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	490/137.2	535.7/193.5	0.451
Hemoglobin 1, g/dL (mean/sd)	13.3/1.9	14.1/1.6	0.055
Hemoglobin 2, g/dL (mean/sd)	12.5/1.7	13.5/1.3	<b>0.008</b>
Hemoglobin 3, g/dL (mean/sd)	10.9/1.5	11.9/1.5	<b>0.007</b>
Hemoglobin 4, g/dL (mean/sd)	13.4/1.7	13.4/1.3	0.792
Platelets 1, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	267,285.7/114,369.7	238,700/53,993.4	0.231
Platelets 2, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	264,428.5/133,926.5	206,844.4/40,279.6	0.200
Platelets 3, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	326,851.8/144,934.3	272,285.7/97,952.2	0.176
Platelets 4, c/mm <sup>3</sup> (mean/sd)	205,100/78,874.9	201,119.0/41,163.0	0.834

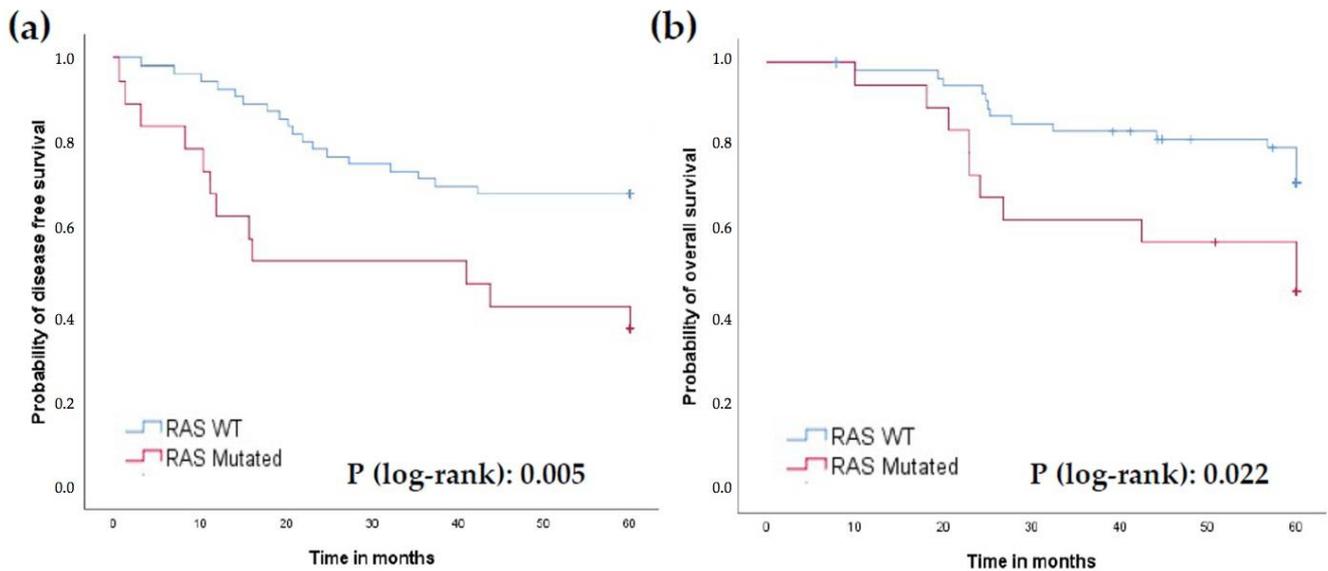
Statistically significant differences are indicated in bold.

**Table 3.** Univariate analysis of hematologic ratios.

Characteristics	Relapse Group	No Relapse Group	p-Value
Neutrophil-Lymphocyte Ratio 1 (mean/sd)	2.5/1.2	2.2/1.3	0.118
Neutrophil-Lymphocyte Ratio 2 (mean/sd)	5.8/4.7	3.8/2.2	0.075
Neutrophil-Lymphocyte Ratio 3 (mean/sd)	5.9/4.1	6.4/5.4	0.912
Neutrophil-Lymphocyte Ratio 4 (mean/sd)	3.8/2.0	3.5/2.2	0.503
Lymphocyte-Monocyte Ratio 1 (mean/sd)	3.5/1.6	3.8/1.4	0.448
Lymphocyte-Monocyte Ratio 2 (mean/sd)	1.5/0.6	2.2/1.5	<b>0.011</b>
Lymphocyte-Monocyte Ratio 3 (mean/sd)	1.8/0.8	1.8/0.8	0.956
Lymphocyte-Monocyte Ratio 4 (mean/sd)	2.2/0.8	2.4/1.3	0.786
Platelet-Lymphocyte Ratio 1 (mean/sd)	137.8/68.4	117.9/54.2	0.206
Platelet-Lymphocyte Ratio 2 (mean/sd)	386.2/290.9	236.4/114.7	<b>0.029</b>
Platelet-Lymphocyte Ratio 3 (mean/sd)	386.3/213.6	331.5/187.8	0.238
Platelet-Lymphocyte Ratio 4 (mean/sd)	217.5/103.1	200.9/89.7	0.519

Statistically significant differences are indicated in bold.

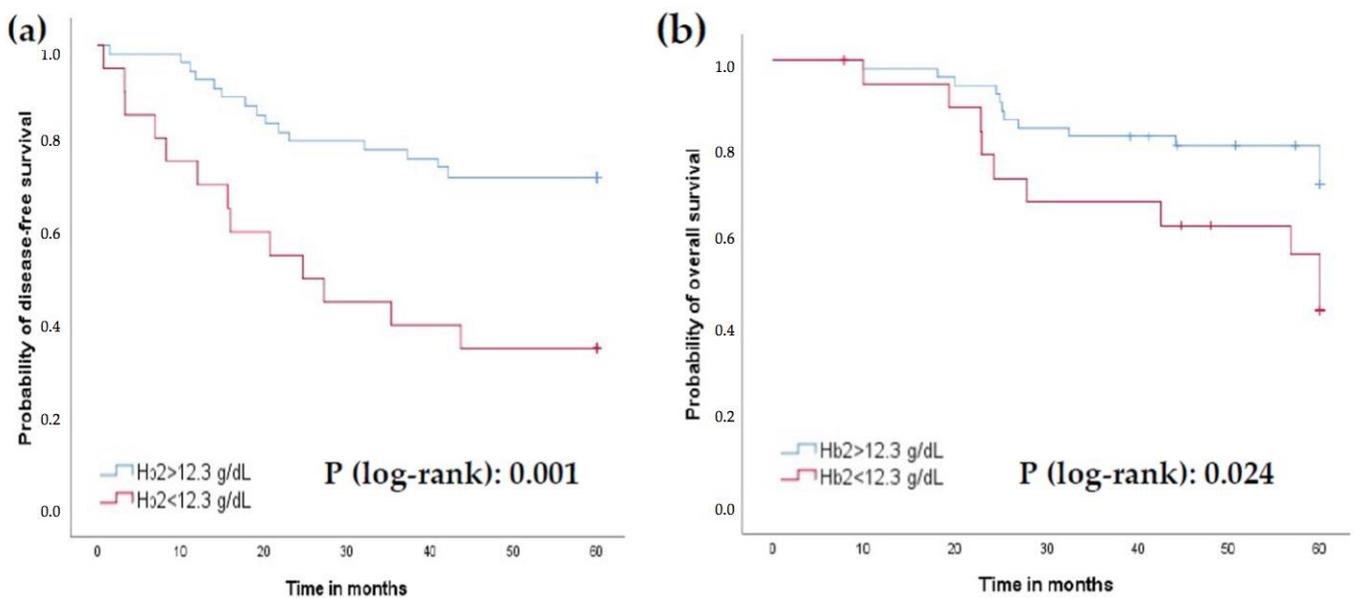
Kaplan–Meier survival analyses demonstrated that patients with mutant KRAS had reduced 5-year PFS (36.8% vs. 68.4%) and OS (47.4% vs. 73.7%) compared to those with wild type (WT) KRAS ( $p = 0.005$  and  $0.022$ , respectively) (Figure 2a,b).



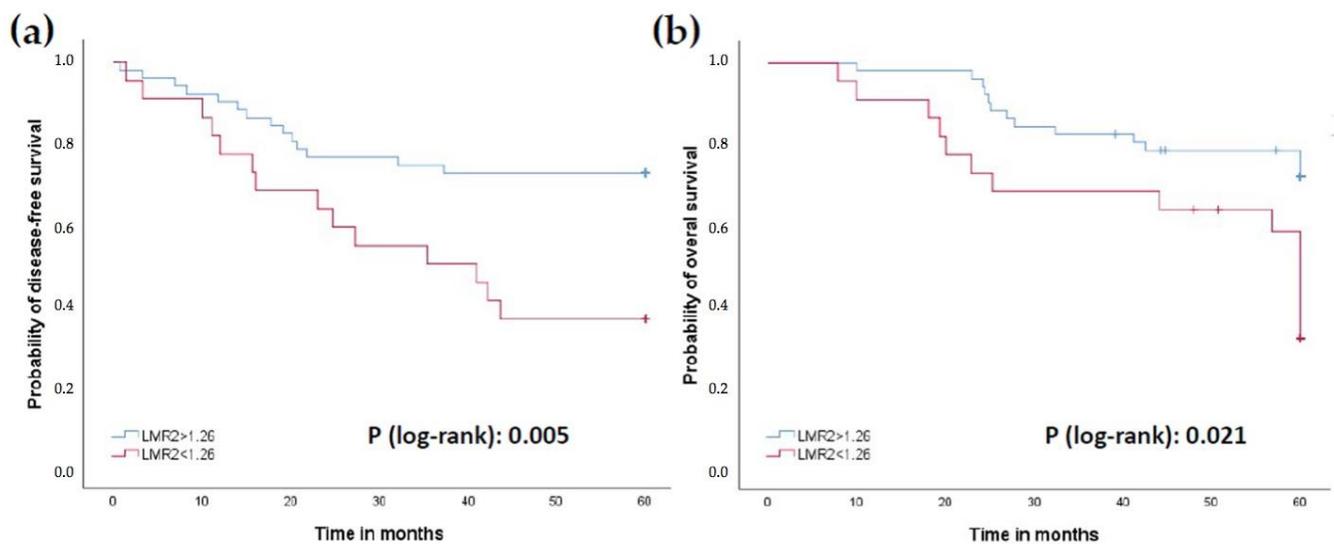
**Figure 2.** Prognostic role of KRAS status. (a) Progression-free survival (PFS). (b) Overall survival (OS).

Given these findings, and in order to find a model that could be used in clinical practice, we decided to find the optimal cut-off point for Hb2, PRL2, and LMR2, since all of them could be determined simultaneously at the second blood draw. From here, we calculated the Youden index [18] from the ROC curves of each variable, obtaining cut-off points of 12.3 g/dL for Hb2, 1.26 for LMR2, and 229.50 for PLR2.

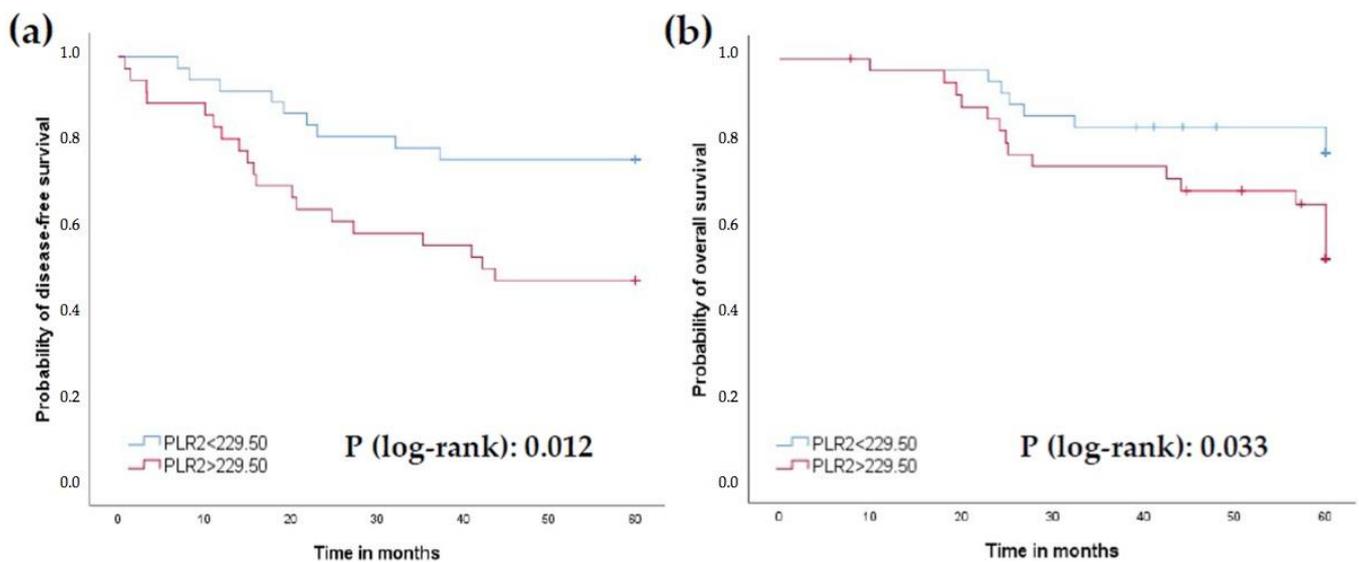
Patients with Hb2 levels lower than 12.3 g/dL had worse 5-year survival PFS (35% vs. 71.7%) and OS (50% vs. 73.6%) compared to those with levels higher than 12.3 g/dL ( $p = 0.001$  and  $0.024$ , respectively; Figure 3a,b). Similar findings were obtained with LMR2 levels lower than 1.26 (5-year PFS 36.4% vs. 72.5% and OS 50% vs. 74.5%;  $p = 0.005$  and  $0.021$ , respectively; Figure 4a,b), and PLR2 levels greater than 229.50 (5-year PFS 47.2% vs. 75.7%; 5-year OS 55.6% vs. 78.4%;  $p = 0.012$  and  $0.033$ , respectively; Figure 5a,b).



**Figure 3.** Prognostic role of Hb2 levels with a cut-off value of 12.3 g/dL. (a) Progression-free survival (PFS). (b) Overall survival (OS).



**Figure 4.** Prognostic role of LMR2 levels with a cut-off value of 1.26. (a) Progression-free survival (PFS). (b) Overall survival (OS).



**Figure 5.** Prognostic role of PLR2 levels with a cut-off value of 229.50. (a) Progression-free survival (PFS). (b) Overall survival (OS).

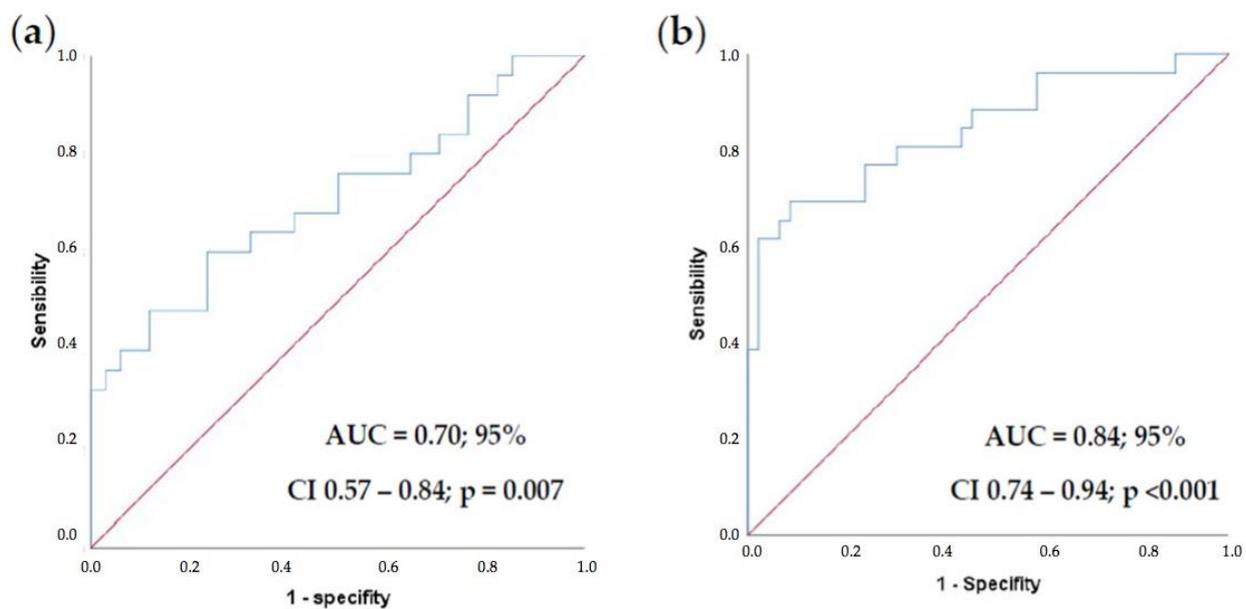
In the multivariate analysis, we used logistic regression to evaluate which independent variables with statistically significant differences in the univariate analysis could be eliminated from the analysis (Table 4). We found that the presence of perineural invasion ( $p = 0.009$ ; 95% CI 2.249–315.037), the presence of lymph node involvement ( $p = 0.007$ ; 95% CI 2.555–397.000), Hb2 levels lower than 12.3 g/dL ( $p = 0.049$ ; 95% CI 1.013–54.509), and LMR2 lower than 1.26 ( $p = 0.037$ ; 95% CI 1.115–34.636) maintained their statistical significance.

**Table 4.** Logistic regression based on relapse.

Predictor	B	SE $\beta$	$\chi^2$	p	OR	95%CI	
						Lower	Upper
KRAS status	0.803	1.047	0.588	0.443	2.232	0.287	17.381
EMVI	1.382	2.269	0.371	0.543	3.983	0.047	340.268
LVI	−0.946	2.578	0.135	0.714	0.388	0.002	60.708
PNI	3.282	1.261	6.775	<b>0.009</b>	26.619	2.249	315.037
ypN	3.461	1.287	7.230	<b>0.007</b>	31.851	2.555	397.000
Hb2 < 12.3	2.006	1.017	3.892	<b>0.049</b>	7.432	1.013	54.509
LMR2 < 1.26	1.827	0.877	4.343	<b>0.037</b>	6.214	1.115	34.636
PLR2 > 229.50	1.867	1.006	3.448	<b>0.063</b>	6.469	0.901	46.425

Abbreviations: EMVI: Extramural venous invasion. LVI: Lymphovascular invasion. PNI: Perineural invasion. ypN: pathological lymph node stage after treatment. Statistically significant differences are indicated in bold.

We decided to create a model using the continuous variables obtained in the second blood draw (Hb2, LMR2, and PLR2). The model with these variables demonstrated acceptable ability to discriminate between groups (AUC = 0.707; 95% CI 0.57–0.84;  $p = 0.007$ ) (Figure 6a). Given the known significance of lymph node involvement as a prognostic factor, we decided to add the number of metastatic lymph nodes (N+) to this model. The model demonstrated an excellent ability to discriminate (AUC = 0.84; 95% CI 0.74–0.94;  $p < 0.001$ ) (Figure 6b).



**Figure 6.** ROC curves for relapse (a) by Hb2, LMR2, and PLR2. (b) by Hb2, LMR2, PLR2, and N+.

Furthermore, the prognostic role of TRG in survival was analyzed. For this purpose, we stratified the patients into two groups based on their TRG (Good = TRG0 and TRG1; Poor = TRG2 and TRG3). No statistically significant differences were observed in PFS at 5 years ( $p = 0.496$ ) or in OS at 5 years ( $p = 0.847$ ) when comparing patients with good response versus poor response to CRT (Supplementary Figure S1a,b). In those patients who presented pathological complete response (TRG0), no significant differences were found either in 5-year PFS ( $p = 0.687$ ) or OS ( $p = 0.961$ ) compared to those who did not achieve a pathological complete response (nonTRG0) (Supplementary Figure S2a,b).

### 3.3. Predictive Factors

We analyzed the clinical, pathological, and analytical parameters obtained before and after nCRT treatment of the groups stratified according to TRG (Supplementary

Tables S2 and S3). Univariate analysis showed that only urea and bilirubin levels prior to the start of neoadjuvant treatment showed statistically significant differences between the two groups. ROC analysis showed poor capacity for the urea variable (AUC = 0.65; 95% CI 0.52–0.79;  $p = 0.035$ ) but acceptable discrimination capacity for bilirubin (AUC = 0.75; 95% CI 0.62–0.88;  $p = 0.001$ ) (Supplementary Figure S3a,b). With these results, a model was created that included both variables, but no improvement in discrimination capacity was obtained (AUC = 0.74; 95% CI 0.61–0.88;  $p = 0.001$ ).

#### 4. Discussion

In this study, we have found that low hemoglobin levels, a low lymphocyte/monocyte ratio, a high platelet/lymphocyte ratio, and a larger number of positive nodes after surgery associated with LARC relapse. In addition, KRAS mutations were associated with a poor prognosis at 5 years, and bilirubin levels were able to predict response to nCRT.

KRAS mutation status had been considered an important prognostic and predictive biomarker for colorectal cancer patients [19]. However, few studies have investigated the role of KRAS mutations in patients with LARC. Our results showed that KRAS mutations were present in 24.7% of patients, a lower frequency than reported in other publications [20–22]. In our study, we found that KRAS mutations were significantly associated with poorer OS and PFS in LARC patients receiving nCRT, but there was no relation between KRAS mutations and TRG. These findings are consistent with a recent meta-analysis [23].

The role of elevated hemoglobin levels before and during preoperative CRT treatment in rectal cancer has been associated in some studies with better local control [24], and lower mortality [25] for patients without anemia, considering a cut-off point at 12 g/dL. In our series, the relapse group persistently presented lower Hb levels than the control group, although they did not fall below the 12 g/dL cut-off until the post-surgery analysis (where the control group also fell below that level). Therefore, we believe that the cut-off for hemoglobin levels must be differently determined depending on the moment of sample analysis.

An elevated LMR has been identified as a prognostic factor for longer survival in colorectal cancer [26,27]. More specifically, in rectal cancer, a worse prognosis has been associated with a lower lymphocyte/monocyte ratio prior to neoadjuvant treatment [28]. On the other hand, an elevated PLR has been described as a poor prognostic factor in advanced colorectal cancer [29]. In rectal cancer, an elevated PLR, also determined before CRT, has been shown to be a poor prognostic factor [30], sometimes together with the NLR [31], although this could not be confirmed in other studies [32].

We need to point out that, in the previously referenced studies, the ratios were calculated at the baseline extraction prior to CRT (our blood draw 1). Although there are few studies investigating longitudinal changes in blood cell count ratios in CRC [33–36], there are no similar studies in LARC. In our case, the ratios that have been shown to play a prognostic role were obtained after CRT therapy and before surgery, that is, at the second blood draw (LMR2 and PLR2). Our study confirms the usefulness of these two parameters as prognostic biomarkers in LARC when they are analyzed at the right moment. Regarding the tumoral regression grading, many studies consider it a surrogate marker of survival, associating a better prognosis with a greater response obtained after neoadjuvant treatment [5–8,37–39]. However, we have not been able to corroborate this aspect in our study, as we did not find statistically significant differences either in 5-year PFS or OS between the groups stratified according to their TRG. One of the possible explanations is that this may be due to the regression grading system used (modified Ryan score [13] in our case) since in the aforementioned bibliography each study used a different grading system.

Regarding the search for potential predictive biomarkers of response to nCRT based on clinical-pathological and analytical characteristics, our study has only managed to establish differences in the levels of urea and bilirubin between both groups, with only bilirubin providing an acceptable sensitivity (AUC = 0.74), although it seems insufficient

for clinical use. In the literature, elevated levels of bilirubin have been correlated with a higher risk of lymph node involvement after surgery [40,41], although the proposed cut-off level (2.6 mmol/L = 0.15 mg/dL) was widely exceeded by the two groups in our study and therefore does not seem to be comparable.

Regarding sample power, in the univariate analyses we found enough sample power for several of the comparisons. For example, in the case of hemoglobin values between the relapse ( $n = 32$ ) and no relapse ( $n = 45$ ) groups, power was 84% for differences equal or higher than 1.1. For PLR2, power was 86% for differences higher than 150. For calculating sample number in logistic regression models, the recommendation is to have ten events per covariable [42]. In our case, the relapse group had 32 variables, so the model could use a maximum of 3 covariables. In Table 4, we used KRAS status and 7 covariables. Although the odds ratios' confidence intervals were ample, there was no problem in the convergence of the model.

Among the limitations of our study, it is necessary to emphasize the small number of patients and the fact that a single center was involved. In addition, the well-known tumor heterogeneity of colorectal cancer [20,43,44] may be the cause for a high variability.

## 5. Conclusions

The findings of this study allow us to confirm that KRAS mutations are associated with a poor prognosis in LARC. We propose a robust prognostic model to determine the risk of relapse in patients with LARC based on the number of positive lymph nodes after surgery, the hemoglobin levels, and the LMR and PLR ratios obtained after neoadjuvant therapy. In addition, bilirubin could have a modest predictive role in response to preoperative treatment. However, both hypotheses need to be confirmed in randomized studies with a larger number of patients.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm11206091/s1>, Figure S1: Impact of TRG on progression free survival (S1a) and overall survival (S1b). Blue: Tumoral Response Grade 0–1. Red: Tumoral response grade 2–3. Figure S2: Impact of Tumoral Grade Response 0 on progression free survival (S2a) and overall survival (S2b). Figure S3: ROC analyses for predictive factors in relation to Tumoral Response Grade. S3a: by urea. S3b: by bilirubin. Table S1: Univariate analysis of biochemical parameters. Table S2: Patient demographics based on tumoral response grading. Table S3: Hematologic parameters based on tumoral response grading.

**Author Contributions:** Conceptualization was designed by A.M.-C., I.M.L., and A.M.; methodology, A.M.; software, I.M.L.; validation, A.M.-C., I.M.L., and A.M.; formal analysis, E.R.-G.; investigation, A.M.-C., S.R.-M., M.A.-L., M.Z.-L., I.M.-A., M.E.d.I.H.-D., and I.M.L.; data curation, A.M.-C.; writing—original draft preparation, A.M.-C.; writing—review and editing, I.M.L. and A.M.; visualization, A.M.; supervision, A.M.; project administration, A.M.; funding acquisition, A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded in part by a grant (PI13/02166) from the Instituto de Salud Carlos III. I.M.L. is supported by a Miguel Servet contract (CPII20/00029) from the Instituto de Salud Carlos III, co-funded by European Social fund (ESF) “Investing in your future”.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Foundation Rioja Salud (CEICLAR, protocol code PI-129, approved 30 July 2013).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef]
2. Sauer, R.; Becker, H.; Hohenberger, W.; Rödel, C.; Wittekind, C.; Fietkau, R.; Martus, P.; Tschmelitsch, J.; Hager, E.; Hess, C.F.; et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1731–1740. [CrossRef]
3. Sauer, R.; Liersch, T.; Merkel, S.; Fietkau, R.; Hohenberger, W.; Hess, C.; Rödel, C. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 1926–1933. [CrossRef]
4. Bosset, J.-F.; Collette, L.; Calais, G.; Mineur, L.; Maingon, P.; Radošević-Jelić, L.; Daban, A.; Bardet, E.; Beny, A.; Ollier, J.-C. Chemotherapy with Preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1114–1123. [CrossRef]
5. Rödel, C.; Martus, P.; Papadopoulos, T.; Füzesi, L.; Klimpfinger, M.; Fietkau, R.; Liersch, T.; Hohenberger, W.; Raab, R.; Sauer, R.; et al. Prognostic Significance of Tumor Regression After Preoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 8688–8696. [CrossRef]
6. Park, I.J.; You, Y.N.; Agarwal, A.; Skibber, J.M.; Rodriguez-Bigas, M.A.; Eng, C.; Feig, B.W.; Das, P.; Krishnan, S.; Crane, C.H.; et al. Neoadjuvant Treatment Response As an Early Response Indicator for Patients With Rectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 1770–1776. [CrossRef]
7. Fokas, E.; Liersch, T.; Fietkau, R.; Hohenberger, W.; Beissbarth, T.; Hess, C.; Becker, H.; Ghadimi, M.; Mrak, K.; Merkel, S.; et al. Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Carcinoma Revisited: Updated Results of the CAO/ARO/AIO-94 Trial. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 1554–1562. [CrossRef]
8. Fokas, E.; Ströbel, P.; Fietkau, R.; Ghadimi, M.; Liersch, T.; Grabenbauer, G.G.; Hartmann, A.; Kaufmann, M.; Sauer, R.; Graeven, U.; et al. Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy as a Prognostic Factor and Individual-Level Surrogate for Disease-Free Survival in Rectal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, djx095. [CrossRef]
9. Dworak, O.; Keilholz, L.; Hoffmann, A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int. J. Color. Dis.* **1997**, *12*, 19–23. [CrossRef]
10. Mandard, A.M.; Dalibard, F.; Mandard, J.C.; Marnay, J.; Henry-Amar, M.; Petiot, J.F.; Roussel, A.; Jacob, J.H.; Segol, P.; Samama, G. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* **1994**, *73*, 2680–2686. [CrossRef]
11. Ryan, R.; Gibbons, D.; Hyland, J.M.P.; Treanor, D.; White, A.; Mulcahy, H.E.; O'Donoghue, D.P.; Moriarty, M.; Fennelly, D.; Sheahan, K. Pathological response following long-course neo-adjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology* **2005**, *47*, 141–146. [CrossRef]
12. AJCC Cancer Staging Manual. Available online: <https://link.springer.com/book/9783319406176> (accessed on 16 August 2022).
13. Protocol for the Examination of Resection Specimens from Patients with Primary Carcinoma of the Colon and Rectum Version: Colon and Rectum Resection 4.1.0.0. Protocol Posting Date: February 2020. Available online: <https://documents.cap.org/protocols/cp-gilower-colonrectum-resection-20-4100.pdf> (accessed on 15 July 2021).
14. Quah, H.; Chou, J.F.; Gonen, M.; Shia, J.; Schrag, D.; Saltz, L.; Goodman, K.A.; Minsky, B.D.; Wong, W.D.; Weiser, M.R. Pathologic stage is most prognostic of disease-free survival in locally advanced rectal cancer patients after preoperative chemoradiation. *Cancer* **2008**, *113*, 57–64. [CrossRef]
15. Dayde, D.; Tanaka, I.; Jain, R.; Tai, M.C.; Taguchi, A. Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 573. [CrossRef]
16. Bedin, C.; Crotti, S.; D'Angelo, E.; D'Aronco, S.; Pucciarelli, S.; Agostini, M. Circulating Biomarkers for Response Prediction of Rectal Cancer to Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2020**, *27*, 4274–4294. [CrossRef]
17. Rodríguez-Tomás, E.; Arenas, M.; Gómez, J.; Acosta, J.; Trilla, J.; López, Y.; Arquez, M.; Torres, L.; Araguas, P.; Hernández-Aguilera, A.; et al. Identification of potential metabolic biomarkers of rectal cancer and of the effect of neoadjuvant radiochemotherapy. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0250453. [CrossRef]
18. Schisterman, E.F.; Perkins, N.J.; Liu, A.; Bondell, H. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiol. Camb. Mass.* **2005**, *16*, 73–81. [CrossRef]
19. Rasmy, A.; Fayed, A.; Omar, A.; Fahmy, N. Effect of KRAS mutational status on disease behavior and treatment outcome in patients with metastatic colorectal cancer: Intratumor heterogeneity and mutational status. *J. Gastrointest. Oncol.* **2019**, *10*, 886–895. [CrossRef]
20. Yang, J.; Lin, Y.; Huang, Y.; Jin, J.; Zou, S.; Zhang, X.; Li, H.; Feng, T.; Chen, J.; Zuo, Z.; et al. Genome landscapes of rectal cancer before and after preoperative chemo-radiotherapy. *Theranostics* **2019**, *9*, 6856–6866. [CrossRef]
21. Jo, P.; Bernhardt, M.; Nietert, M.; König, A.; Azizian, A.; Schirmer, M.A.; Grade, M.; Kitz, J.; Reuter-Jessen, K.; Ghadimi, M.; et al. KRAS mutation status concordance between the primary tumor and the corresponding metastasis in patients with rectal cancer. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0239806. [CrossRef]
22. Bahnassy, A.A.; Abdel-Azim, Y.A.; Ezzat, S.; Abdellateif, M.S.; Zekri, A.-R.N.; Mohanad, M.; Salama, A.; Khaled, H. The role of circulating tumor cells and K-ras mutations in patients with locally advanced rectal cancer: A prospective study. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 9645–9657. [CrossRef]
23. Peng, J.; Lv, J.; Peng, J. KRAS mutation is predictive for poor prognosis in rectal cancer patients with neoadjuvant chemoradiotherapy: A systemic review and meta-analysis. *Int. J. Colorectal. Dis.* **2021**, *36*, 1781–1790. [CrossRef]

24. Rades, D.; Kuhn, H.; Schultze, J.; Homann, N.; Brandenburg, B.; Schulte, R.; Krull, A.; Schild, S.E.; Dunst, J. Prognostic Factors Affecting Locally Recurrent Rectal Cancer and Clinical Significance of Hemoglobin. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2008**, *70*, 1087–1093. [[CrossRef](#)]
25. McGrane, J.M.; Humes, D.J.; Acheson, A.G.; Minear, F.; Wheeler, J.M.; Walter, C.J. Significance of Anemia in Outcomes After Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *Clin. Colorectal. Cancer.* **2017**, *16*, 381–385. [[CrossRef](#)]
26. Chan, J.C.Y.; Chan, D.L.; Diakos, C.I.; Engel, A.; Pavlakis, N.; Gill, A.; Clarke, S.J. The Lymphocyte-to-Monocyte Ratio is a Superior Predictor of Overall Survival in Comparison to Established Biomarkers of Resectable Colorectal Cancer. *Ann. Surg.* **2017**, *265*, 539–546. [[CrossRef](#)]
27. Tan, D.; Fu, Y.; Tong, W.; Li, F. Prognostic significance of lymphocyte to monocyte ratio in colorectal cancer: A meta-analysis. *Int. J. Surg.* **2018**, *55*, 128–138. [[CrossRef](#)]
28. Yamamoto, A.; Toiyama, Y.; Okugawa, Y.; Oki, S.; Ide, S.; Saigusa, S.; Araki, T.; Kusunoki, M. Clinical Implications of Pretreatment: Lymphocyte-to-Monocyte Ratio in Patients With Rectal Cancer Receiving Preoperative Chemoradiotherapy. *Dis. Colon. Rectum.* **2019**, *62*, 171–180. [[CrossRef](#)]
29. Gui, W.; Wang, X.; Luo, Y.; Wang, J. Platelet to lymphocyte ratio as a prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer undergoing palliative treatment. *Ann. Palliat. Med.* **2020**, *9*, 3271–3277. [[CrossRef](#)]
30. Ergen, Ş.A.; Barlas, C.; Yıldırım, C.; Öksüz, D.Ç. Prognostic Role of Peripheral Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR) and Platelet-Lymphocyte Ratio (PLR) in Patients with Rectal Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *J. Gastrointest. Cancer* **2022**, *53*, 151–160. [[CrossRef](#)]
31. Ke, T.-M.; Lin, L.-C.; Huang, C.-C.; Chien, Y.-W.; Ting, W.-C.; Yang, C.-C. High neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio predict poor survival in rectal cancer patients receiving neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy. *Medicine* **2020**, *99*, e19877. [[CrossRef](#)]
32. Dudani, S.; Marginean, H.; Tang, P.A.; Monzon, J.G.; Raissouni, S.; Asmis, T.R.; Goodwin, R.A.; Gotfrit, J.; Cheung, W.Y.; Vickers, M.M. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios as predictive and prognostic markers in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiation. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 664. [[CrossRef](#)]
33. Li, Z.; Zhao, R.; Cui, Y.; Zhou, Y.; Wu, X. The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio can predict clinical outcome in stage I–III colon cancer. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9453. [[CrossRef](#)]
34. Ashizawa, N.; Furuya, S.; Katsutoshi, S.; Sudo, M.; Akaike, H.; Hosomura, N.; Kawaguchi, Y.; Amemiya, H.; Kawaida, H.; Inoue, S.; et al. Clinical Significance of Dynamic Neutrophil-Lymphocyte Ratio Changes in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 2311–2317. [[CrossRef](#)]
35. Nemoto, T.; Endo, S.; Isohata, N.; Takayanagi, D.; Nemoto, D.; Aizawa, M.; Utano, K.; Togashi, K. Change in the neutrophil-to-lymphocyte ratio during chemotherapy may predict prognosis in patients with advanced or metastatic colorectal cancer. *Mol. Clin. Oncol.* **2021**, *14*, 107. [[CrossRef](#)]
36. Herold, Z.; Herold, M.; Lohinszky, J.; Szasz, A.M.; Dank, M.; Somogyi, A. Longitudinal changes in personalized platelet count metrics are good indicators of initial 3-year outcome in colorectal cancer. *World J. Clin. Cases* **2022**, *10*, 6825–6844. [[CrossRef](#)]
37. McCoy, M.J.; Hemmings, C.; Hillery, S.; Penter, C.; Bulsara, M.K.; Zeps, N.; Platell, C.F. Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer: How important is tumour regression? *ANZ J. Surg.* **2017**, *87*, E233–E239. [[CrossRef](#)]
38. Xu, L.; Cai, S.; Xiao, T.; Chen, Y.; Qiu, H.; Wu, B.; Lin, G.; Sun, X.; Lu, J.; Zhou, W.; et al. Prognostic significance of tumour regression grade after neoadjuvant chemo-radiotherapy for a cohort of patients with locally advanced rectal cancer: An 8-year retrospective single-institutional study. *Color. Dis.* **2017**, *19*, O263–O271. [[CrossRef](#)]
39. Tominaga, T.; Akiyoshi, T.; Yamamoto, N.; Oba, K.; Nagasaki, T.; Yamaguchi, T.; Konishi, T.; Fukunaga, Y.; Ueno, M. Prognostic value of metastatic lymph node regression grade after neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer. *Surgery* **2019**, *166*, 1061–1067. [[CrossRef](#)]
40. Gao, C.; Fang, L.; Li, J.-T.; Zhao, H.-C. Significance and prognostic value of increased serum direct bilirubin level for lymph node metastasis in Chinese rectal cancer patients. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 2576–2584. [[CrossRef](#)]
41. Gao, C.; Li, J.-T.; Fang, L.; Wen, S.-W.; Zhang, L.; Zhao, H.-C. Pre-operative Predictive Factors for Intra-operative Pathological Lymph Node Metastasis in Rectal Cancers. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 6293–6299. [[CrossRef](#)]
42. Peduzzi, P.; Concato, J.; Kemper, E.; Holford, T.R.; Feinstein, A.R. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J. Clin. Epidemiol.* **1996**, *49*, 1373–1379. [[CrossRef](#)]
43. Hardiman, K.M.; Ulintz, P.J.; Kuick, R.D.; Hovelson, D.; Gates, C.M.; Bhasi, A.; Grant, A.; Liu, J.; Cani, A.K.; Greenson, J.K.; et al. Intra-tumor genetic heterogeneity in rectal cancer. *Lab. Invest.* **2016**, *96*, 4–15. [[CrossRef](#)]
44. Frydrych, L.M.; Ulintz, P.; Bankhead, A.; Sifuentes, C.; Greenson, J.; Maguire, L.; Irwin, R.; Fearon, E.R.; Hardiman, K.M. Rectal cancer sub-clones respond differentially to neoadjuvant therapy. *Neoplasia* **2019**, *21*, 1051–1062. [[CrossRef](#)]